

**Doktori (Ph.D.) értekezés**

**Nagy Valéria**

**Biológia Doktori Iskola**

**Szeged**

**2015**

**Aszkorbát-függő alternatív elektrontranszport  
növényekben és az aszkorbát szerepe a  
*Chlamydomonas reinhardtii*  
hidrogéntermelésének szabályozásában**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Nagy Valéria

Témavezetők: Dr. Tóth Szilvia Zita és Dr. Garab Győző

Magyar Tudományos Akadémia  
Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Növénybiológiai Intézet

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Biológia Doktori Iskola

Szeged

2015

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>3</b>
<b>2. BEVEZETÉS .....</b>	<b>5</b>
2.1. A fotoszintézis .....	5
2.1.1. A fotoszintézis folyamata és a kloroplasztisz szerkezete .....	5
2.1.2. A fotoszintetikus elektrontranszportlánc komponensei.....	8
2.2. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> fotoszintetikus hidrogéntermelése.....	14
2.3. Hő- és fénystressz hatása a második fotokémiai rendszerre.....	18
2.4. Az aszkorbát mint lehetséges PSII elektrondonor .....	19
<b>3. CÉLKITŰZÉS .....</b>	<b>22</b>
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....</b>	<b>23</b>
4.1. A növények és a <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> törzsek nevelése .....	23
4.2. Módszerek .....	24
4.2.1. A kísérletek során használt kezelések .....	24
4.2.1.1. Hő- és fénykezelések .....	24
4.2.1.2. Kémiai kezelések .....	25
4.2.2. Mérési módszerek.....	25
4.2.2.1. A klorofilltartalom meghatározása .....	25
4.2.2.2. Az aszkorbát tartalom meghatározása .....	26
4.2.2.3. A keményítőtartalom meghatározása .....	27
4.2.2.4. A tilakoidmembránok izolálása .....	27
4.2.2.5. Gyors klorofill-a fluoreszcencia tranziensek (OJIP) mérése.....	28
4.2.2.6. Az ETR, NPQ és qE paraméterek meghatározása.....	28
4.2.2.7. P <sub>700</sub> oxidációs-redukciós kinetikai mérések .....	29
4.2.2.8. Termolumineszcencia mérések .....	29
4.2.2.9. 515 nm-es elektrokróm abszorpcióttranziens mérések.....	29
4.2.2.10. Hidrogén- és oxigéngáz meghatározása gázkromatográfiával .....	30
4.2.2.11. <i>In vitro</i> hidrogenáz aktivitás mérések.....	30
4.2.2.12. Western blot analízis .....	30
4.2.2.13. Statisztikai elemzés .....	31
<b>5. EREDMÉNYEK .....</b>	<b>32</b>
5.1. Az alternatív elektrondonor azonosítása.....	32
5.1.1. Az aszkorbát a PSII alternatív elektrondonora .....	32
5.1.2. Az elektronátadás útvonala az aszkorbát és a PSII között.....	36

5.1.3. Az aszkorbát-függő alternatív elektrontranszport aktivitása élettanilag releváns hőkezelés esetén .....	37
5.2. Az aszkorbát PSII alternatív elektrondonorként betöltött élettani szerepe .....	38
5.2.1 Aszkorbát-hiányos és túltermelő <i>Arabidopsis thaliana</i> mutánsok fotoszintetikus jellemzői .....	38
5.2.2. Az aszkorbát alternatív elektrondonorként véd a fotoinhibícióval szemben.....	41
5.2.3. A hőkezelt levelek PSII fehérjéinek fényindukált degradációja .....	46
5.2.4. A hőkezelést követő helyreállítás mértéke függ a levelek aszkorbát-tartalmától .....	47
5.3. Az aszkorbát elektrontranszportra és hidrogéntermelésre gyakorolt hatása <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> sejtekben.....	48
5.3.1. Az aszkorbát a PSII alternatív elektrondonora <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> sejtekben .....	48
5.3.2. Az aszkorbát hatása a <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> törzsek hidrogéntermelésére ..	50
5.3.3. Az aszkorbát mennyiségének változása kénmegvonás során.....	52
5.3.4. Az aszkorbát hatása a vízbontó komplexre .....	53
5.3.5. Az S-01 és CC-124 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> törzsek keményítőtartalmának alakulása a kénmegvonás során.....	57
5.3.6. Az S-01 és CC-124 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> törzsek <i>in vitro</i> hidrogenáz aktivitása.....	59
<b>6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA .....</b>	<b>60</b>
6.1. Az aszkorbát a PSII alternatív elektrondonora .....	60
6.2. Az aszkorbát PSII alternatív elektrondonorként betöltött élettani szerepe .....	61
6.3. Az aszkorbát hatása a <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> hidrogéntermelésére .....	64
<b>7. KÖVETKEZTETÉSEK.....</b>	<b>68</b>
<b>8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK .....</b>	<b>69</b>
<b>9. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>70</b>
<b>10. SUMMARY .....</b>	<b>73</b>
<b>11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>76</b>
<b>12. IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>77</b>

**1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

cit b <sub>6</sub> f	citokróom b <sub>6</sub> f
CP43, CP47	a második fotokémiai rendszer belső fénybegyűjtő antenna komplexei
DCMU	3-(3,4-diklorofenil)-1,1-dimetilurea
DMF	dimetil-formamid
DPC	difenilkarbazid
DTT	ditiotritol
D1, D2	a második fotokémiai rendszer reakciócentrum fehérjéi
Fd	ferredoxin
F <sub>o</sub> , F <sub>m</sub>	a klorofill-a fluoreszcencia indukció kezdeti és maximális értéke
F <sub>m</sub> '	a klorofill-a fluoreszcencia maximális értéke fényadaptált állapotban
F <sub>m</sub> "	megvilágítást követő néhány perces sötétadaptáció után mért klorofill-a fluoreszcencia maximális értéke
F <sub>v</sub>	változó fluoreszcencia (F <sub>m</sub> -F <sub>o</sub> )
GC	gázkromatográfia
LHCI	a PSI klorofill a/b fénybegyűjtő pigment-protein komplexe
LHCII	a PSII fő klorofill a/b fénybegyűjtő pigment-protein komplexe
Mn-centrum	a PSII vízbontó komplexének aktív centruma, aminek felépítésében négy Mn-, egy Ca- és egy Cl-ion vesz részt
n.d.	nem detektálható
NDH	NAD(P)H dehidrogenáz enzim
NPQ	nem-fotokémiai kioltás (non-photochemical quenching)
PC	plasztocianin
PPBQ	fenil-para-benzokinon
PQ	plasztokinon
PQH <sub>2</sub>	plasztokinol
PsbO	a vízbontó komplex 33 kDa-os külső fehérjéje
PSI	első fotokémiai rendszer (Photosystem I)
PSII	második fotokémiai rendszer (Photosystem II)
P <sub>680</sub>	a második fotokémiai rendszer elsődleges elektrondonora
P <sub>700</sub>	az első fotokémiai rendszer elsődleges elektrondonora
r.e.	relatív egység
Q <sub>A</sub>	a második fotokémiai rendszer elsődleges kinon akceptora
Q <sub>B</sub>	a második fotokémiai rendszer másodlagos kinon akceptora

---

OEC	vízbontó komplex (oxygen evolving complex)
OJIP tranziens	gyors klorofill-a fluoreszcencia indukció
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SSTF	reakciócentrumonként egyetlen töltésszétválasztást indukáló telítési fényimpulzus (saturating single turnover flash)
TAP	Tris-acetát-foszfát tartalmú tápoldat a <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> kultúra nevelésére
TL	termolumineszcencia
Tyr <sub>Z</sub> , Tyr <sub>D</sub>	tirozin Z és tirozin D, a D1 és D2 fehérjék redox aktív aminosav oldalláncai

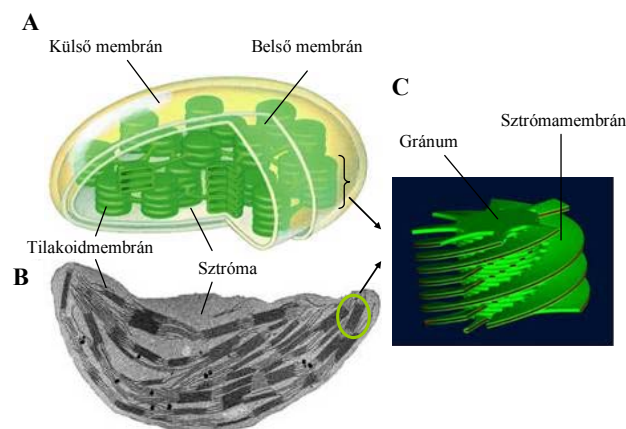
## 2. BEVEZETÉS

### 2.1. A fotoszintézis

#### 2.1.1. A fotoszintézis folyamata és a kloroplasztisz szerkezete

A fotoszintézis során a növények és a fotoszintetizáló baktériumok a napfény energiáját felhasználva szerves anyagokat állítanak elő. A fotoszintetizáló élőlényeket két csoportra osztjuk: oxigéntermelőkre és nem oxigéntermelőkre (Blankenship, 2001). Az első csoportba tartoznak a növények, cianobaktériumok, amelyek a szén-dioxid ( $\text{CO}_2$ ) asszimilációjához a vizet használják fel elektrondonorként, és a víz oxidációja során molekuláris oxigén ( $\text{O}_2$ ) szabadul fel. A második csoportba tartoznak a bíorbaktériumok, zöld kénbaktériumok és helikobaktériumok, amelyek azon kívül, hogy nem termelnek  $\text{O}_2$ -t, abban is különböznek az előző csoporttól, hogy víz helyett egyéb szerves (szukcinát) anyagokat használnak elektrondonorként. A fotoszintézis folyamatát nevezhetjük a Földünk egyik legalapvetőbb folyamatának, hiszen az így keletkező szénhidrátok nélkülözhetetlenek a magasabb rendű életformák számára. Az  $\text{O}_2$  termelése és a  $\text{CO}_2$  megkötése alapvető szerepet játszott a Föld légkörének kialakulásában és egyensúlyának fenntartásában (Blankenship, 1992; Nelson és Ben-Shem, 2004).

Az oxigéntermelő élőlények esetében a fotoszintézis folyamata a fényfüggő fotofizikai és fotokémiai folyamatokból, valamint a Calvin-Benson ciklusból áll. A fotoszintetikus elektrontranszport révén a fényenergia kémiai energiává alakul, ami ATP és NADPH formájában stabilizálódik, amelyek a Calvin-Benson ciklusban a szén-dioxid redukciójára használandók fel. Ezen folyamatok a növények esetében a kloroplasztiszban mennek végbe (1. ábra).



**1. ábra.** A magasabb rendű növények kloroplasztiszanak sematikus szerkezete (A), transzmissziós elektron mikroszkópos képe (B; A és B ábra: <http://facweb.bhc.edu/academics/science/robertsk/biol100/cells.htm> ) és a sztrómamembránok gránum körüli elhelyezkedését bemutató számítógépes modell (C; Mustárdy és Garab, 2003).

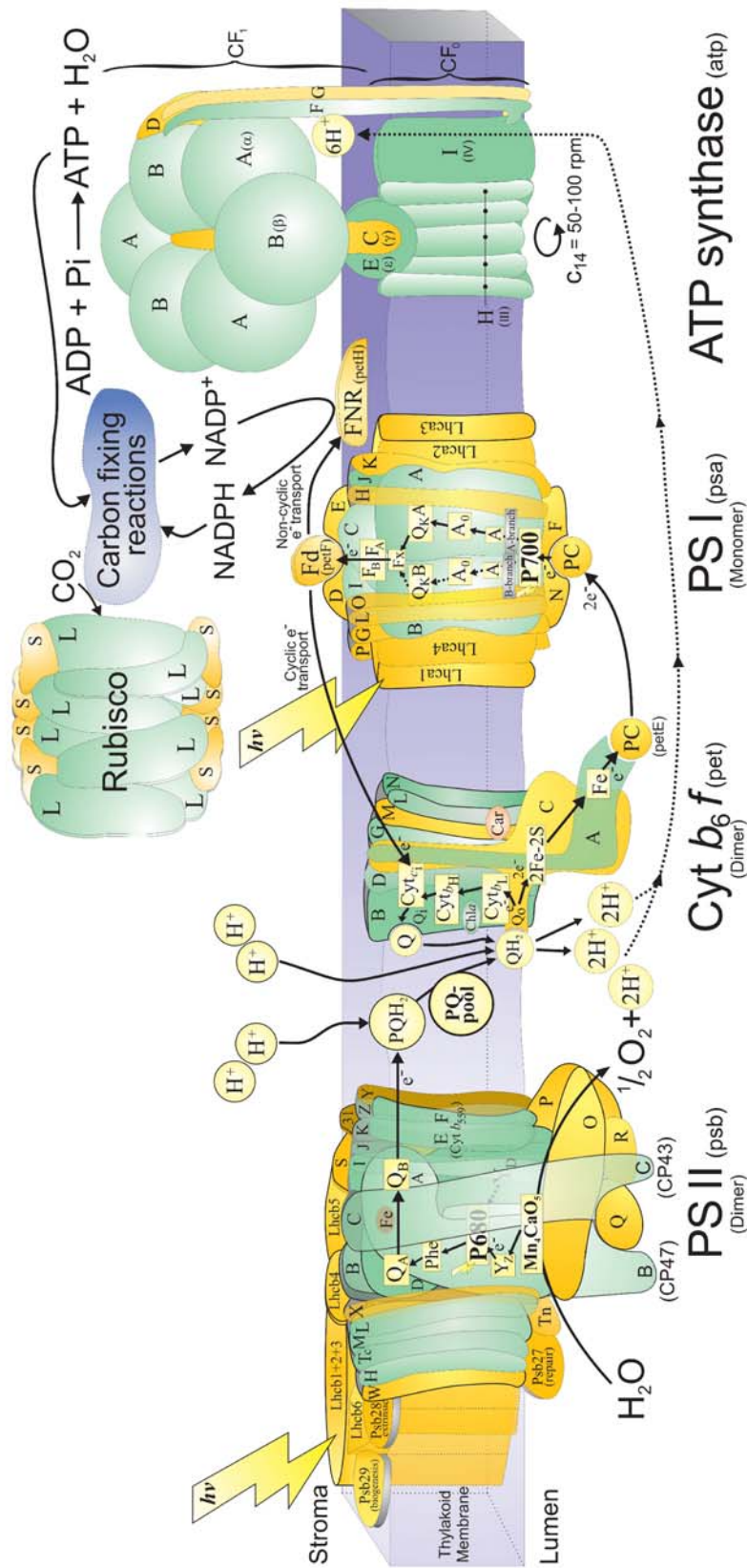
A kloroplasztisz legtöbb esetben lencse alakú, kettős (magasabb rendű növényekben és zöldalgákban; Staehelin, 2003; Austin és Staehelin, 2011) vagy többszörös (kovamoszatokban és vörösalgákban; Kroth és Strotmann, 1999, McFadden és van Dooren 2004) membránnal határolt sejtorganelum. A belső membránnal körülvett részt sztrómának nevezzük; itt található a kloroplasztisz DNS-e, keményítő és számos enzim, melyek alapvető szerepet játszanak a kloroplasztisz metabolizmusában.

A kloroplasztisz sztrómájába beágyazódva helyezkedik el a tilakoidmembrán, amely a kloroplasztisz belső membránrendszerét képezi (1. ábra). A magasabb rendű növényekben a tilakoidmembránok helyenként szorosan összetapadva henger alakú gránumokat hoznak létre. A gránumok átmérője kb. 400-600 nm és egy gránum 5-20 tilakoidmembrán-rétegből tevődik össze (Mustárdy és Garab, 2003; Mullineaux, 2005; Pribil és mtsai., 2014). A gránumokhoz kvázi helikális elrendeződésben sztrómatilakoidok csatlakoznak (Mustárdy és Garab, 2003; Mustárdy és mtsai., 2008; Kouřil és mtsai., 2011). Ezáltal a sztrómatilakoidok és a gránumok egy összefüggő membránrendszert hoznak létre (Shimoni és mtsai., 2005; Mustárdy és mtsai., 2008). A tilakoidmembrán belső vizes fázisát lumennek nevezzük.

Minden fotoszintetizáló szervezetben megtalálhatók a tilakoidmembránba ágyazódott vagy ahhoz kapcsolódó különböző pigment-fehérje komplexek, amelyek a fény abszorpciójára képes klorofill-molekulákat és különböző kísérőpigmenteket, mint pl. karotinoidokat és fikobilineket tartalmaznak. A fotoszintetikus elektrontranszportlánc komponenseit alkotó fő fehérjekomplexek a következők: a második fotokémiai rendszer (PSII), a citokróm  $b_6f$  komplex (cit  $b_6f$ ), az első fotokémiai rendszer (PSI) és az ATP-szintáz (2. ábra). A PSII és fő fénybegyűjtő komplexe (LHCII, light harvesting complex II) elsősorban a gránummembránokban (Andersson és Anderson, 1980), a PSI, az LHCI és az ATP-szintáz a nem tapadt membránokban – a sztrómamembránban és a gránumvégmembránokban – helyezkedik el (Pribil és mtsai., 2014), míg a cit  $b_6f$  komplex mindkét típusú membránban megtalálható (Dekker és Boekema, 2005; Nevo és mtsai., 2012). A sztrómamembránban jelen vannak még a ciklikus elektrontranszportlánc komponensei is: a NAD(P)H dehidrogenáz (NDH) komplex és a PGRL1-PGR5 heterodimer (Lennon és mtsai., 2003; Rumeau és mtsai., 2007; Hertle és mtsai., 2013), azonban PGRL1 homodimereket a gránumban is találtak (Hertle és mtsai., 2013).

A két fotokémiai rendszer és a cit  $b_6f$  komplex egymással sorba kapcsolva fényenergia felhasználásával egy kémiai potenciálgrádienssel szembeni elektrontranszportot valósít meg, amely a víz oxidációjától ( $\sim +800$  mV) a NADP<sup>+</sup> redukciójáig tart ( $\sim -400$  mV). Az elektrontranszport a tilakoidmembrán két oldala közötti protontranszferhez kapcsolts, amely a sztrómából protonokat juttat a tilakoid lumenébe. Ez a protontranszport a víz oxidációjából





**2. ábra.** A fotoszintetikus elektrontranszport-lánc fő fehérje komplexekének szerveződése és felépítése, valamint az elektron és proton transzport útvonal *A. thaliana* tilakoidmembránjában. (PSII - második fotokémiai rendszer, cyt  $b_6f$  - citokróm  $b_6f$ , PSI - első fotokémiai rendszer, ATP synthase - ATP-szintáz, PQ - plasztokinon,  $\text{PQH}_2$  - plasztokinol, tilakoid membrane - tilakoidmembrán, carbon fixing reaction -  $\text{CO}_2$  fixáció, cyclic  $e^-$  transport - ciklikus  $e^-$  transzport, non-cyclic  $e^-$  transport - nem-ciklikus  $e^-$  transzport; Allen és mtsai., 2011).

származó protonokkal együtt megnöveli a proton koncentrációt a lumenben. Az így létrejött proton motoros erő (proton grádiens és elektromos tér) biztosítja az energiát az ATP képződéséhez (Nelson és Yocum, 2006).

A PhD munkám során az oxigéntermelő fotoszintézissel foglalkoztam magasabb rendű növényekben és *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalgában. Így a továbbiakban csak ezen élőlények fotoszintetikus komplexeit mutatom be.

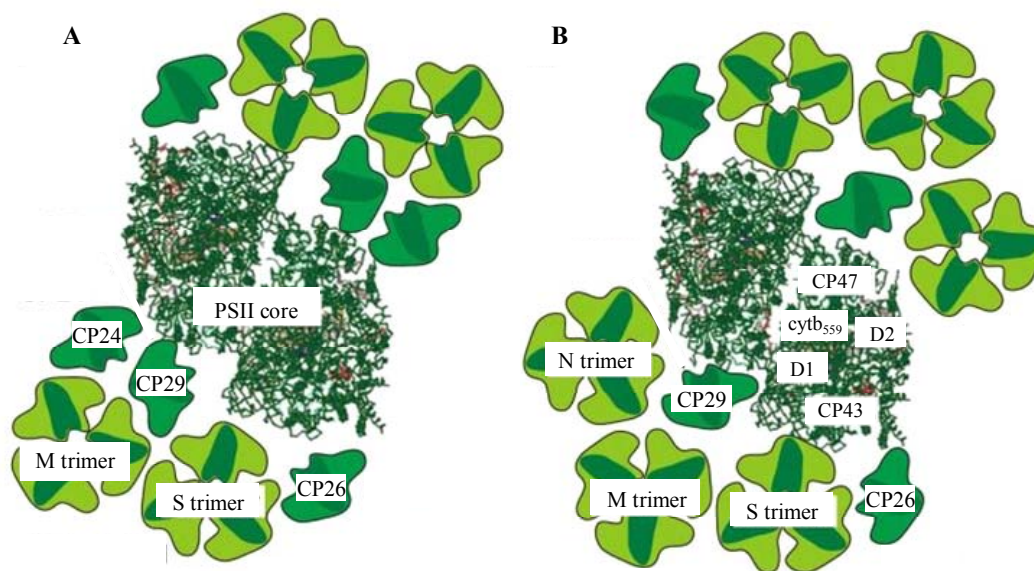
### 2.1.2. A fotoszintetikus elektrontranszportlánc komponensei

#### *A második fotokémiai rendszer felépítése és működése*

A PSII általában dimer formában van jelen (2. és 3. ábra). Maga a monomer rész az ún. „core” komplexből és a külső vagy perifériális fénybegyűjtő proteinkomplexekből (LHCII) tevődik össze. A core komplex felépítése és működése nagyon hasonló magasabb rendű növényekben, algákban (3. ábra) és cianobaktériumokban. Ezen komplex magában foglalja a PSII reakciócentrumot, a belső antennát és különböző kisebb core alegységeket (PsbE, PsbF, PsbH, PsbW; Drop és mtsai., 2014). A D1 (PsbA) és a D2 (PsbD) fehérjék heterodimere valamint a citokróm  $b_{559}$   $\alpha$  (PsbE) és  $\beta$  (PsbF) alegysége együtt alkotják a reakciócentrumot. A D1 és D2 fehérjék tartalmazzák a PSII által katalizált elektronátadási folyamathoz szükséges különböző kofaktorokat, amelyek a következők: négy klorofill-a molekula (a  $P_{D1}$  és a  $P_{D2}$ , amely egy speciális klorofill-a dimert a  $P_{680}$ -at alkotja, illetve a két járulékos klorofill: a  $Chl_{D1}$  és a  $Chl_{D2}$ ; Caffari és mtsai., 2014; Nadtchenko és mtsai., 2014), két feofitin molekula, a  $Q_A$  és a  $Q_B$  kinon akceptorok, valamint a  $Tyr_Z$  és  $Tyr_D$ , amelyek a D1 és D2 fehérjék redox aktív aminosav reziduálisai. A reakciócentrumban található még két további ( $Chl_{ZD1}$  és  $Chl_{ZD2}$ ; Barber 2008) klorofill-a és két  $\beta$ -karotin pigmentmolekula, valamint az elsődleges és másodlagos kinon akceptor között egy nem hembben lévő Fe-ion is. A D1 és D2 fehérjéhez közvetlenül kapcsolódik egy-egy protein (CP43 és CP47), amelyek egyenként a 13 és a 16 klorofill-a molekula mellett néhány  $\beta$ -karotin molekulát is tartalmaznak (Umena és mtsai., 2011). A CP43 (PsbC) és CP47 (PsbB) fehérjék a PSII belső (proximális) fénybegyűjtő antennájaként működnek (Barber, 2008, Caffari és mtsai., 2009; van Amerongen és Croce, 2013).

A core komplexhez kapcsolódik a perifériális antenna komplex, amely hat (Lhcb1-6) különböző pigment-protein komplexből épül fel (3A ábra). Az Lhcb4 (CP29), Lhcb5 (CP26) és a Lhcb6 (CP24) komplexek monomer formában vannak jelen 1:1:1 sztöchiometriai arányban (Dekker és Boekema, 2005; Kouřil és mtsai., 2012). Az Lhcb1, 2 és 3 proteinek heterotrimereket alkotnak, különböző összetételben. Ezen trimereket megkötő erős (S, strong)

affinitású kötőhely a CP29 és CP26 oldalon, míg a közepes (M, medium) affinitású a CP29 és CP24-hez közel található (Dekker és mtsai., 2005; Caffarri és mtsai., 2009; Drop, 2014). Az LHCII fehérjék a klorofill *a/b* mellett különböző xantofill-molekulákat (lutein, neoxantin, violaxantin, anteraxantin, zeaxantin) is tartalmaznak (Croce és mtsai., 2002; Liu és mtsai., 2004; Standfuss és mtsai., 2005; Passarini, 2009; Pan és mtsai., 2011).



**3. ábra.** A PSII-LHCII szuperkomplex felépítése magasabb rendű növényekben (A; spenót) és *C. reinhardtii* zöldalgákban (B). Az ábra Minagawa (2013) cikke alapján készült.

A *C. reinhardtii* nevű zöldalga LHCII komplexe valamelyest eltérő felépítést mutat a magasabb rendű növényekéhez képest (3. ábra). Esetükben 9 gén (LhcbM1-M9) kódolja a trimereket alkotó LHCII proteineket. Ezen géneket a szekvenciahomológiájuk alapján négy típusba sorolhatjuk: I típusú (LhcbM3, 4, 6, 8 és 9), II típusú (LhcbM5), III típusú (LhcbM2 és 7), IV típusú (LhcbM1) (Teramoto és mtsai., 2001; Minagawa és Takahaski, 2004). A növényekben ismert S és M trimerek kötőhelyei mellett az algasejtekben még egy harmadik (N) trimerkötőhely is megtalálható (3B ábra), ami a CP24 helyét foglalja el, ugyanis ez zöldalgák esetében hiányzik (Elrad és Grossman, 2004; Merchant és mtsai., 2007). A CP29 (Lhcb4) és a CP26 (Lhcb5) pigment-protein komplexek a *C. reinhardtii* sejtekben is jelen vannak, és szintén monomerek formájában figyelhetők meg (Minagawa, 2013; Drop és mtsai., 2014).

A csak klorofill-*a*-t tartalmazó D1, D2, valamint a CP43 és CP47 fehérjék genetikai kódja a kloroplasztisban van, míg az LHCII klorofill-*a/b*-t tartalmazó proteinjeinek kódja a sejtmagban található (Allen és mtsai., 2011).

A PSII külső és belső antennája által elnyelt fényenergia a PSII reakciócentrumába jut, ezáltal a  $P_{680}$  gerjesztett állapotba kerül. A gerjesztett  $P_{680}$  redoxpotenciálja kellően negatív ahhoz, hogy a térben elegendően közel elhelyezkedő feofitin molekulának egy elektront adjon át és kb. 3 ps alatt végbemenjen a primer töltésszétválasztás. A redukált feofitintről a  $Q_A$ -ra 250-300 ps alatt jut át az elektron, míg a redukált  $Q_A$ - $Q_B$  között 0,1-0,2 ms alatt történik meg az első és 0,4-0,5 ms alatt a második elektronátadás. A  $Q_B$  a két elektron és két proton felvétele után leválik a PSII-ről a mobilis plasztokinon pool-ba, ahonnan újabb PQ tud bekötődni a D1-re (Nelson és Yocum, 2006; Barber, 2003, 2008).

A  $P_{680}^+$  számára az elsődleges elektrondonor a tirozin Z ( $Tyr_Z$ ), ami a D1 fehérje 161. aminosava. Itt az elektronátadás 20 ns alatt történik meg, azonban ez függ az elektrontranszportlánc egy másik komponensétől, nevezetesen a vízbontó komplex (OEC) Mn-csoportjától.

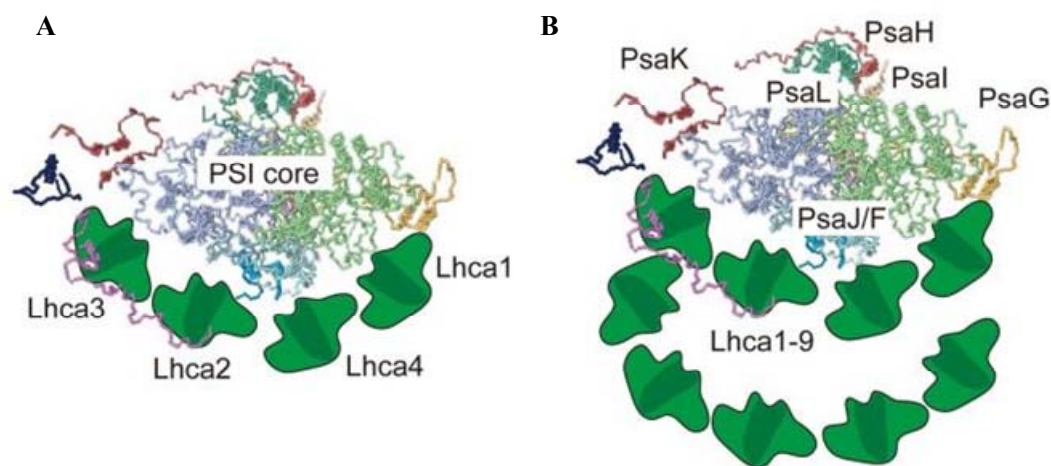
Az OEC a PSII donor oldalán található, és itt zajlik le a víz oxidációja. Ezen folyamat során felszabaduló 4 elektron továbbítódik a reakciócentrum felé, miközben  $O_2$  szabadul fel. Az OEC tartalmaz egy Mn-centrumot, amelyet négy Mn-ion, egy  $Ca^{2+}$  és egy  $Cl^-$  alkot, amelyet kívülről hidrofíli fehérjék (PsbO, PsbP, PsbQ, PsbR) vesznek körbe (Allahverdiyeva és mtsai., 2013; Pagliano és mtsai., 2013). A víz oxidációjához szükséges négy pozitív töltést a Mn-ionok különböző oxidációs állapotai biztosítják, amelyeket S-állapotoknak hívunk (Kok és mtsai., 1970). A reakciócentrumban négy egymást követő töltésszeparáció a Mn-centrumból négy elektron egymást követő elvonásával az ún.  $S_0$  kiindulási állapotból  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$  állapot hoz létre. Az  $S_4$  állapot a víz oxidációjából származó négy elektron elvonása után visszaalakul  $S_0$  állapotba (Dau és mtsai., 2012; Vinyard és mtsai., 2013). Az OEC-ből az elektronok 0,1-0,8 ms alatt jutnak el az oxidált  $Tyr_Z$ -re (McEvoy és Brudvig, 2006; Barber, 2008).

#### *Az első fotokémiai rendszer felépítése és működése*

A PSI fehérjekomplex (2. és 4. ábra) hajtja végre a ferredoxin (Fd) redukcióját és a plasztocianin (PC) oxidációját. A PSII-höz hasonlóan a PSI is core-ból és perifériás fénybegyűjtő komplexből (LHCI) felépülve hozza létre a PSI-LHCI szuperkomplexet (2. és 4. ábra), amely magasabb rendű növények és algák esetében monomer formában van jelen.

A PSI core-ban található két nagyobb fehérje alegység a PsaA és PsaB, amelyek heterodimer formája alkotja a reakciócentrumot, amit kb. 20 kisebb fehérjealegység vesz körbe (Croce és von Amerongen, 2013). A PSI core összesen 96-102 klorofill-a és 22  $\beta$ -karotinmolekulát tartalmaz (Fromme és mtsai., 2001; Amunts és mtsai., 2010), amelynek

legnagyobb részét a PsaA és a PsaB alegységek kötik, így a PSI belső antennájaként funkcionálnak, míg a kisebb alegységek csak néhány klorofillmolekulát tartalmaznak (Jensen és mtsai., 2007). A reakciócentrumban helyezkednek el a PSI elektrontranszportlánc kofaktorai: az elsődleges elektrondonor a  $P_{700}$ , az elsődleges akceptor az  $A_0$ , amely egy monomer klorofill-a molekula, a másodlagos akceptor az  $A_1$ , ami egy fillokinon, illetve a heterodimerben megtalálható még az Fx-el jelölt vas-kén centrum [4Fe-4S] valamint még egy fehérje (PsaC), amely két vas-kén centrummal [4Fe-4S] is rendelkezik, melyeket  $F_B$  és  $F_A$ -val jelölnék.



**4. ábra.** A PSI-LHCI szuperkomplex felépítése magasabb rendű növényekben (A; borsó) és *C. reinhardtii* zöldalgákban (B; Minagawa, 2013).

A fluoreszcencia-maximumuk alapján hosszú ideig úgy gondolták, hogy az LHCI antenna két komplexből épül fel, az LHCI-730, melynek felépítésében az Lhca1 és Lhca4 proteinek vesznek részt és az LHCI-680, ami az Lhca2 és Lhca3-ból áll (Lam és mtsai., 1984; Bassi és mtsai., 1985). Mára már tisztázódott, hogy a négy Lhca komplex két funkcionálisan azonos dimerbe szerveződve (Lhca1-4 és Lhca2-3; 4A ábra) alkotja a PSI külső antennarendszerét (Wientjes és Croce, 2011). A biokémiai és spektroszkópiai vizsgálatokból az is kiderült, hogy alacsony hőmérsékleten (77 K) mindkét dimer fluoreszcencia-maximuma 730 nm-en van. Mindegyik Lhca 13-14 klorofill (Ben-Shem és mtsai., 2003) és 5 karotinoid molekulát köt, főleg luteint, valamint violaxantin és  $\beta$ -karotin is előfordul. A PSII-től eltérően, a PSI antennája nem tartalmaz neoxantint (Wientjes és Croce, 2011).

A *C. reinhardtii* zöldalgában kilenc Lhca gén kódolja az LHCI fehérjéket (Elrad és Grossmann, 2004). A növényekhez hasonlóan az Lhca1-4 és Lhca2-3 fehérjék dimerjei közvetlenül a core körül helyezkednek el, egy belső félkört kialakítva, amelyhez az algákban

ezen kívül még öt Lhca (5-9) fehérje kapcsolódik egy külső félkört alkotva (4B ábra; Drop és mtsai., 2011).

Megvilágítás hatására miután a PSI-ben lévő  $P_{700}$  gerjesztett állapotba kerül, átad egy elektront a reakciócentrumban elhelyezkedő primer akceptornak ( $A_0$ ), így  $P_{700}^+$  válik belőle. Ez az oxidált forma fogadja be az elektronokat a plasztocianin felől, ez a folyamat 20-200  $\mu$ s alatt megy végbe. A  $P_{700}$ -ról az elektronok az elsődleges ( $A_0$ ) majd a másodlagos akceptorra ( $A_1$ ) kerülnek (40-200 ps), ahonnan a vas-ként tartalmazó komponenseken ( $F_X$ ,  $F_B$  és az  $F_A$ ) keresztül (15-500  $\mu$ s) végül a ferredoxinra kerülnek (0,5-20  $\mu$ s; Nelson és Yocum, 2006).

#### *A citokróom $b_6f$ komplex felépítése és működése*

A PSII-től a PSI felé irányuló elektrontranszport a  $citb_6f$  komplex (2. ábra) közvetítésével valósul meg. Szerepe a plasztokinol ( $PQH_2$ ) oxidációjában és a PC redukciójában van, mindeközben protont pumpál a sztrómából a tilakoidlumenbe, protongrádiens kialakítva a tilakoidmembrán két oldala között.

A  $citb_6f$  egy nyolc alegységből felépülő szimmetrikus dimer komplex (2. ábra). A négy nagyobb alegységhez tartozik a cit f (petA), melynek felépítésében egy hem csoport vesz részt, a cit  $b_6$  (petB), amely egy magas és egy alacsony redoxpotenciálú hemet ( $b_H$  és  $b_L$ ) tartalmaz, a Rieske-féle vas-kén [2Fe-2S] protein (petC) és a IV-es alegység (petD). A négy kisebb alegység pedig a Pet G, M, L és N fehérjékből áll (Baniulis és mtsai., 2008). A  $citb_6f$  komplex kristályszerkezetének vizsgálata során monomerenként egy nem kovalensen kötött klorofill-a és egy  $\beta$ -karotin molekulát figyeltek meg a magasabb rendű növények (Huang és mtsai., 1994) és *C. reinhardtii* sejtek (Pierre és mtsai., 1997) esetében is (Cramer és mtsai., 2006).

A cit  $b_6f$  komplex homológiát mutat a mitokondriumban (Crofts, 2004; Rich, 2004) és a biborbaktériumokban (*Rhodobacter sphaeroides*, Esser és mtsai., 2008) található cit  $bc_1$ -vel. A cit  $b_6f$  komplex két kinonkötőhellyel ( $Q_0$ ,  $Q_i$ ) rendelkezik. A lumenhez közeli részén lévő  $Q_0$  a komplex számára elektronokat szolgáltató plasztokinolt ( $PQH_2$ ) tudja megkötni. A  $PQH_2$  oxidációjából származó két elektron két különböző irányban haladhat tovább. Az egyik irány a magas potenciálú út, amely a Rieske-féle vas-kén centrumon és a cit f-en keresztül vezet a komplex lumen felőli oldalán található PC-hoz, ami mobilis fehérjeként elhagyja a komplexet. Az alacsony potenciálú út a cit  $b_6$ -ból áll, amelynek közvetítésével a szemikinon elektronjai a  $Q_i$  kötőhelyre kerülnek, ahol egy újabb elektron a szemikinont  $PQH_2$ -lá redukálja, ami a  $Q_i$  kötőhelyről leválva  $Q_0$ -ra kerül, bezárva ezzel az ún. Q-ciklust. A PQ redukciója két proton sztrómából való felvételével jár, mely két proton a kinol oxidációja során a lumenbe szabadul



fel, miközben a két elektron a PSI-felé továbbítódik (Kurusu és mtsai., 2003; Cramer és mtsai., 2006).

### *Az ATP-szintáz felépítése*

Az ATP-szintáz ( $CF_0F_1$ , 2. ábra), amely a transzmembrán elektromos teret és a protongrádienszt felhasználva ADP és anorganikus foszfát ( $P_i$ ) felhasználásával ATP-t állít elő, két fő részre osztható. A  $CF_0$ , amelyet négy különböző hidrofób alegység (I, II, III, IV) alkot (Pick és Racker, 1979; Fromme és mtsai., 1987) 1:1:14:1 sztöchiometriai arányban (Seelert és mtsai., 2000, 2003). Ez az alegység protoncsatornaként működik a tilakoidmembránban, illetve ez köti a membránhoz az enzim másik részét, a  $CF_1$ -et, amely a tilakoidmembrán sztróma felőli oldalán helyezkedik el. A  $CF_1$  rész ötféle ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) hidrofil alegységből épül fel (Nelson és mtsai., 1972) 3:3:1:1:1 sztöchiometriai arányban (Süss és Schmidt, 1982; Moroney és mtsai., 1983). A  $\beta$ -alegységen három (T, L, O) katalitikusan aktív nukleotidkötőhely figyelhető meg, míg az  $\alpha$ -alegységen három nem katalitikus nukleotidkötőhely található. Ezeknek fontos szerepük van az ATP szintézisében és hidrolízisében (Boyer, 1993, 1998; Capaldi és Aggeler, 2002).

Az ATP képződése ADP-ből és  $P_i$ -ből energiakonzerválással járó folyamat. Ezen folyamatok során a kötőhelyek három különböző konformációban vannak jelen. Az első vagy nyitott konformációban az enzim szubsztrátot képes kötni, második vagy zárt állapotban egyensúly áll be a kötött termék (ATP) és a megkötött szubsztrát között (ADP,  $P_i$ ), harmadik vagy félig nyitott állapotban pedig a kötőhely affinitása kisebb az ATP-hez. Az ATP-nek az enzimkomplexről való leválásához energia szükséges, amit a  $H^+$ -koncentrációkülönbség biztosít. Amikor a  $H^+$ -ok kölcsönhatásba lépnek a  $CF_0$ -lal és áthaladnak a csatornán a  $\gamma$ -alegység  $360^\circ$ -os elfordulását idézik elő, ami viszont az összes katalitikusan aktív hely egyidejű konformációváltozását váltja ki, melynek következtében a képződött ATP leválik a  $CF_1$ -ről (Junge és mtsai., 1997; Junge, 2004; Böttcher és Gräber, 2008).

### *Az elektrontranszportlánc mobilis elemei*

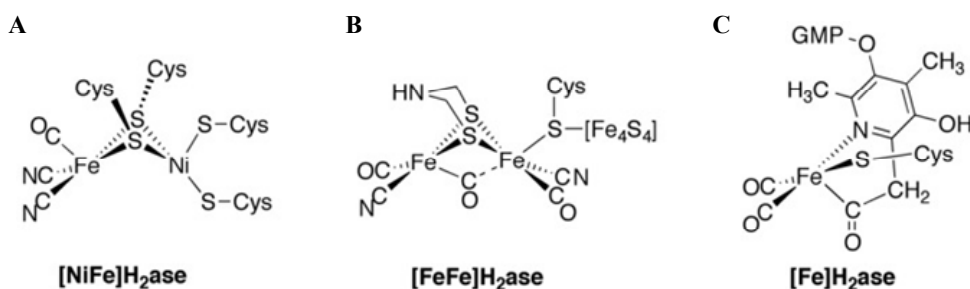
A fentebb már említett elektrontranszportlánc mobilis elemeihez tartozik a PQ, a PC és a Fd, amelyek összekötést biztosítanak a tilakoidmembránban stabilan elhelyezkedő komponensek (PSII,  $cyt_{b_6f}$  komplex, PSI) között (2. ábra). A PQ a tilakoidmembrán lipidrétegében mozogva biztosít kapcsolatot a PSII és a  $cyt_{b_6f}$  komplex között. A PC a lumenális térben mozogva, a  $cyt_{b_6f}$  komplex és a PSI közötti elektrontranszportban vesz részt.

A sztrómában lévő Fd egyik lehetősége, hogy az elektront a PSI-ről a ferredoxin:NADP oxidoreduktázhoz (FNR) juttatja, ami  $\text{NADP}^+$  redukciót eredményez (2. ábra). A másik lehetőség az, hogy részt vesz a ciklikus elektrontranszportban, ami a PSI-PQ-pool-citb<sub>6</sub>f komplex között történik meg.

A ciklikus elektrontranszport két útvonalon keresztül valósulhat meg. Az egyik lehetőség az NDH-függő útvonal, amikor is a NADPH:plasztokinon oxidoreduktáz (NDH) enzim közvetítésével az elektronok a NADPH-ról visszakerülnek a PQ-ra (Munekage és mtsai., 2004; Johnson, 2011). A másik lehetőség a *pgr5* (proton grádiens regulátor gén)-függő útvonal, amikor a ferredoxin-plasztokinon (FQR) oxidoreduktáz segítségével redukált Fd-ról az elektronok a PQ-ra jutnak vissza. Az első útvonal rotenon, míg a második antimicin-szenzitív (Shikanai, 2007).

## 2.2. *Chlamydomonas reinhardtii* fotoszintetikus hidrogéntermelése

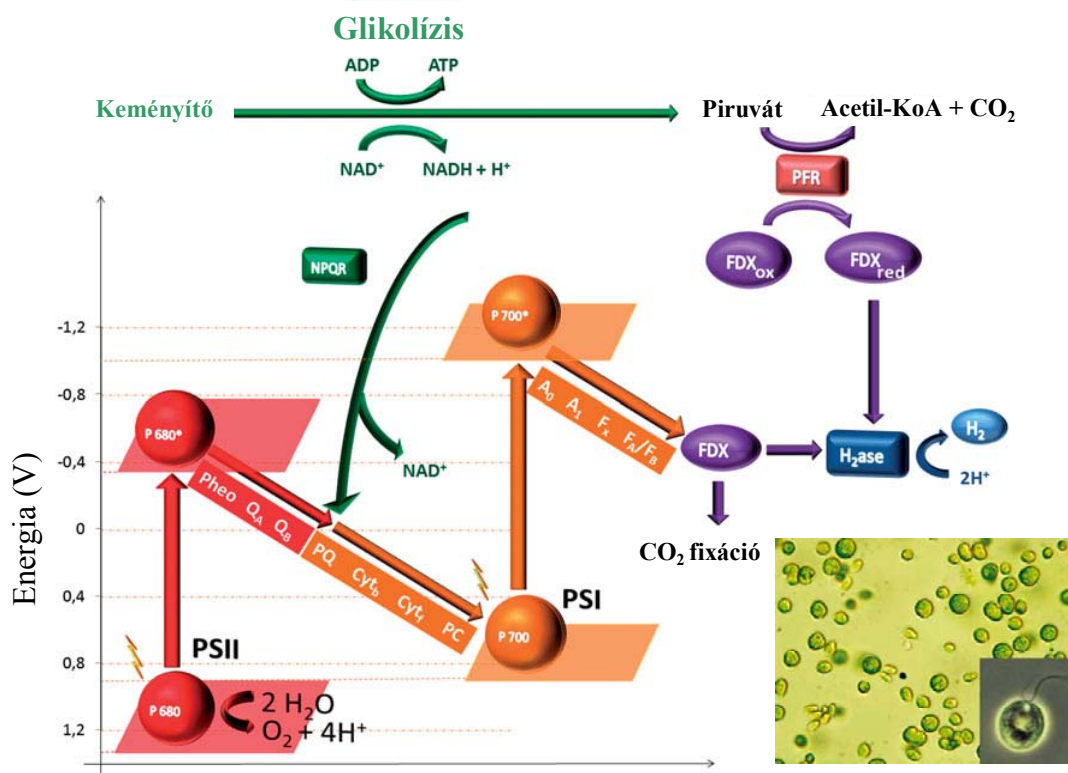
A fotoszintetikus elektrontranszport során keletkező redukáló erők (NADPH, ATP és redukált Fd) elsődlegesen a  $\text{CO}_2$  redukciójára fordítódnak a Calvin-Benson ciklusban, azonban a NADPH és a redukált Fd számos más reakcióban is szerepelhet elektrondonorként, mint pl. a szulfát és a nitrát redukációjában. Bizonyos fajokban, pl. zöldalgákban speciális körülmények között a redukált Fd molekuláris hidrogén ( $\text{H}_2$ ) felszabadulása közben oxidálódhat vissza.



**5. ábra.** A Ni-Fe (A), Fe-Fe (B) illetve a Fe-S centrumot nem tartalmazó Fe vagy Hmd (C) hidrogenázok ( $\text{H}_2$ ase) aktív centrumának felépítése (<http://en.wikipedia.org/wiki/Hydrogenase>).

A  $\text{H}_2$  reverzibilis oxidációját és redukcióját hidrogenázok katalizálják. Ezen enzimek fém tartalmú fehérjék, amelyek többsége vas-kén csoportot tartalmaz, illetve az aktív centrumban valamilyen fématom is megtalálható (Mulder és mtsai., 2011). Aszerint, hogy az aktív centrumukban milyen fématomok találhatóak, megkülönböztetünk [Ni-Fe]-, [Fe-Fe]- illetve Fe-S centrumot nem tartalmazó [Fe]- vagy más néven Hmd-hidrogenázokat (5. ábra; Vignais és Colbeau, 2004).





**6. ábra.** A hidrogéntermelés útvonalai *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalgákban. A hidrogén termelődhet a direkt útvonalon a víz fotolíziséből érkező (piros színnel jelölve), indirekt útvonalon a keményítő bontásból származó (zöld színnel jelölve) illetve sötétben, anaerob módon a piruvát oxidációjából keletkező elektronokból (lila színnel jelölve). ( $\text{H}_2\text{ase}$  - hidrogenáz, FDX - ferredoxin, PFR - piruvát ferredoxin oxidoreduktáz, NPQR - NAD(P)H-plasztokinon oxidoreduktáz (növényekben NDH). Az ábra Torzillo és mtsai. (2014) cikke alapján készült.

Az egyik legnépszerűbb, hidrogéntermelésre képes egysejtű zöldalga a *C. reinhardtii* (6. ábra), amely kiváló alanya a legkülönbözőbb genetikai, mikrobiológiai és biotechnológiai kutatásoknak (Harris, 2001). Gyorsan növekszik, osztódási ideje kevesebb, mint 10 óra, ugyanakkor rövid életciklusa van (kevesebb, mint 2 hét), ami ugyancsak megkönnyíti a rajta végzett kísérleteket. Sejtjei haploidok és egyszerű szeretlen sokat tartalmazó táptalajon autotróf módon nevelhetők. Energiához fotoszintézis segítségével jut, de képes aerob körülmények között heterotróf módon, teljes sötétségben is életben maradni, ha a táptalaj alternatív szénforrásként acetátot tartalmaz. Az acetátot még anaerob körülmények között is képes hasznosítani fény jelenlétében (ún. fotoheterotróf életmód).

A *C. reinhardtii* kloroplasztisz sztrómájában, a PSI akceptor oldalán, egy 48 kDa-os, Fe-Fe típusú hidrogenáz enzim található ( $\text{HydA1}$  és  $\text{HydA2}$ ; 5. ábra), amely a működéséhez szükséges elektronokat közvetlenül a Fd-től kapja (Happe és Naber, 1993; Happe és mtsai., 1994). Az elektronok a hidrogenáz enzimhez három útvonalon keresztül érkehetnek (Torzillo és mtsai., 2014). Ezek: i) a PSII-függő útvonal, ahol az elektronok a vízbontásból keletkeznek és a PSII- $\text{cyt}_\text{b}_6\text{f}$ -PSI-en át vezető lineáris elektrontranszporton keresztül jutnak el a

hidrogenázhoz (Ghirardi és mtsai., 2000); ii) a PSII-független útvonal, amelyben az elektronok a hidrogéntermelés kezdeti aerob szakaszában nagy mennyiségben felhalmozódott keményítő lebontásából származnak és a PQ-pool-on keresztül csatlakoznak a lineáris elektrontranszporthoz (Gfeller and Gibbs, 1984); iii) a sötétben, anaerob módon történő fermentációs útvonal, ilyenkor a glikolízisben keletkező piruvát a piruvát-oxidoreduktáz (PFX) segítségével acetil-Ko-A-vá alakul, miközben ferredoxin redukálódik, ahonnan az elektronok a hidrogenáz enzimre kerülnek (Noth és mtsai., 2012; 6. ábra).

A *C. reinhardtii* hidrogenáz enzime nagyon érzékeny az O<sub>2</sub>-re, jelenlétében a hidrogéntermelés gátolt (Happe és Kaminski, 2002; Forestier és mtsai., 2003, Volgusheva és mtsai., 2013). E probléma kiküszöbölésére Melis és mtsai. (2000) kidolgoztak egy módszert, amelynek a lényege, hogy *C. reinhardtii* sejteket normál kén tartalmú tápoldatban nevelik, majd a sejteket kénmentes tápoldatba helyezik át (Ghirardi és mtsai., 2000; Kosourov és Seibert, 2009; Antal és mtsai., 2012). A kénnek fontos szerepe van egyrészt a fotoszintézisben, másrészt az endogén szubsztátok felépítésében és lebontásában, ezáltal nagyon jelentős hatással van a sejtek életfolyamataira (Williams és Bess, 2014). Kénmegvonás hatására a fehérjeszintézis és ezáltal a sejtek osztódása rövid idő alatt leáll. Leggyorsabban a PSII reakciócentrumok inaktiválódnak feltételezhetően a D1 gyors turnover miatt (Wykoff és mtsai., 1998; Zhang és mtsai., 2002, Scoma és mtsai., 2012), de a PSI reakciócentrum fehérjéit, a cit b<sub>6</sub>f komplexet és az antennát alkotó fehérjék degradációját kevésbé befolyásolja (Melis és mtsai., 2000; Zhang és mtsai., 2002). Kén hiányában a sejtek szaporodni sem tudnak, sőt, mikroszkópos vizsgálatok során az is kiderült, hogy kénmegvonás alatt a *C. reinhardtii* sejtek morfológiai változáson is keresztülmennek. A normál ellipszis alakú sejtől már a kénmegvonás és hidrogéntermelés korai időszakában (0-24 h) szélesebb és gömbölyűbb sejtek alakulnak ki, viszont a kénmegvonás és hidrogéntermelés előrehaladtával (24-120 h) már a sejttömeg csökkenése is bekövetkezik (Zhang és mtsai., 2002).

A sejtek respirációját a kénmegvonás kevésbé befolyásolja, mint a fotoszintézist, és ennek következtében a kultúra anaerobbá válik (Ghirardi és mtsai., 2000; Melis és mtsai., 2000; Kosourov és mtsai., 2002; Zhang és mtsai., 2002). Az anaerob körülmények a PQ-pool redukált állapotát okozzák, ami a PSII aktivitás további csökkenéséhez vezet (Antal és mtsai., 2003).

Anaerob körülmények között megindul a hidrogenáz enzim szintézise és a hidrogéntermelés, amely több napon át tart a nevelési körülményektől függően (Ghirardi és mtsai., 2000; Melis és mtsai., 2000). Az algakultúra a kénmegvonás alatt öt fázison megy keresztül, ezek az aerob, az oxigéntermelés csökkenésének fázisa, az anaerobiózis, a

hidrogéntermelés és a terminális fázis (Kosourov és mtsai., 2002). A PSII jelentős szerepet játszik a hidrogéntermelés folyamatában: i) a lineáris elektrontranszport biztosítja a redukáló erő legjelentősebb részét a hidrogéntermelés folyamatához (Spruit, 1958; Greenbaum és mtsai., 1983), ii) a PSII aktivitása elengedhetetlen a kénmegvonás kezdetén bekövetkező keményítő-felhalmozódáshoz, ami szintén jelentős elektronforrásként szolgál a hidrogenáz számára (Kessler, 1974, Bamberger és mtsai., 1982, Melis és Happe, 2001; Chochois és mtsai., 2009), ugyanis a NAPDH reduktáz a keményítő oxidációja révén szolgáltat elektronokat a PQ-pool számára, ami ezeket a PSI-re továbbítja, végül a Fd közvetítésével a hidrogenázra kerülnek (Florian és mtsai., 2001) iii) viszont a víz oxidációja során felszabaduló molekuláris oxigén erősen gátolja a hidrogenáz enzim aktivitását.

A PSII alapvető szerepét a hidrogéntermelés során alátámasztja az a megfigyelés, hogy a teljesen inaktív PSII-vel rendelkező *C. reinhardtii* mutáns nem képes  $H_2$  termelésre (Zhang és mtsai., 2002). Makarova és mtsai. (2007) munkájukban olyan D1 mutáns sejteket használtak hidrogéntermeltetésre, amiben a PSII aktivitása korlátozott volt, és az oxigéntermelő aktivitás kb. 20%-os volt a vadtypusúhoz képest. Azt tapasztalták, hogy a kultúra anaerobbá válása gyorsabban megtörténik, de kevesebb keményítő halmozódik fel, sőt csekély a termelt  $H_2$  mennyisége is, ami korrelál az alacsony keményítőtartalommal (Makarova és mtsai., 2007). Markov és mtsai. (2006) azt is megfigyelték, hogy a fotoinhibíció kénmegvonás nélkül is képes anaerobiózist előidézni, ami a hidrogéntermelés beindulásához vezet. Feltételezték, hogy a hőstressz a Mn-csoport inaktivációja révén a PSII oxigéntermelő képességét megszünteti, ami a fotoinhibícióhoz hasonlóan anaerob körülményeket idéz elő.

Zhang és mtsai. (2002), megállapították, hogy a Rubisco enzim károsodása is viszonylag korán megindul (Marín-Navarro és mtsai., 2010), ami a keményítő-akkumuláció leállását eredményezi (White és Melis, 2006). Posewitz és mtsai. (2004) megfigyelték, hogy a keményítő-felhalmozódás is hatással van a hidrogenáz kódoló génnek kifejeződési szintjére és egy összetettebb kapcsolatot vélnek feltételezni a lineáris elektrontranszport, a keményítő-felhalmozódás és a hidrogéntermelés beindulása között.

A keményítő bontásából származó elektronok jelentőségét jól mutatja az a megfigyelés, hogy ha a *C. reinhardtii* fotoszintetikus hidrogéntermelését 3-(3,4-diklorofenil)-1,1-dimetilureával (DCMU) gátoljuk, ami a PSII-ben a  $Q_A$  és  $Q_B$  közötti elektrontranszportot blokkolja, a hidrogéntermelés lecsökken, de nem szűnik meg (Kessler, 1974; Bamberger és mtsai., 1982; Melis és Happe, 2001; Chochois és mtsai., 2009). A 2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-p-benzokinon (DBMIB) ezzel szemben teljesen megszünteti a hidrogéntermelést (Stuart és Gaffron, 1972), mivel jelenlétében a cit  $b_6f$  komplexen keresztüli elektrontranszport gátolt.

### 2.3. Hő- és fénystressz hatása a második fotokémiai rendszerre

A fotoszintetikus elektrontranszportlánc számos környezeti stresszhatás során szenvedhet károsodást. Magas fényintenzitás hatására a feleslegben elnyelt fényenergia hatására a PSII akceptor oldalának telítettsége miatt megnő a  $\text{Phe}^-$  és  $\text{P}_{680}^+$  közötti töltésrekombináció gyakorisága, ami triplet állapotú  $\text{P}_{680}$  képződésével jár (Vass és mtsai., 1992; Aro és mtsai., 1993, Vass és Cser, 2009). A triplet állapotú  $\text{P}_{680}$  a triplet állapotú  $\text{O}_2$ -vel reagálva szinglet oxigént hoz létre. Ez a reaktív gyök károsítja a D1 fehérjét (Vass, 2012), aminek következtében a PSII reakciócentrumok elveszítik aktivitásukat. Ezt nevezzük akceptor oldali fotoinhibíciónak (Vass, 2012).

A fotoinhibíció másik fő elmélete szerint viszont az elsődleges károsodás nem a reakciócentrumban, hanem a donor oldalon következik be, a Mn-ionok fényabszorpciója miatt (Tyystjärvi, 2008; Vass, 2012). Ebben az esetben a keletkezett gyökök a D1 fehérje szintézisét gátolják meg (Nishiyama és mtsai., 2006; Murata és mtsai., 2007). Mivel a D1 fehérje élettartama nagyon rövid, az újraszintézis gátlása a fehérje mennyiségének drasztikus csökkenését és a PSII inaktiválódását okozza. Ezt az elméletet donor-oldali fotoinhibíciónak nevezzük.

Az UV tartományba eső napsugarak veszélyt jelenthetnek a fotoszintetizáló élőlények számára. A növényekben az UV sugárzás elsődleges célpontjai a nukleinsavak, a Calvin-Benson ciklus enzimei és a fotoszintetikus apparátus, ezen belül is főleg a PSII komponensei (Vass és mtsai., 1996). Az UV fényben – Mn-ionok abszorpciója miatt – a Mn-centrum sérülése miatt a vízbontás megszűnik, aminek következtében szabadgyökök keletkeznek a PSII-ben. Az UV-B sugárzás hatására  $\text{OH}^\cdot$  (Hideg és Vass, 1996), míg az UV-A sugárzás esetén szinglet oxigén halmozódik fel a reakciócentrumokban (Mackerness, 2000; Turcsányi és Vass, 2000; Desikan és mtsai., 2001; Barta és mtsai., 2004; Vass, 2012).

A fotoszintetikus elektrontranszport a magas hőmérsékletre is érzékeny (Allakhverdiev és mtsai., 2008). A magas hőmérséklet befolyásolja a sejtek membránjainak állapotát és a proteinek konformációját. A hő károsítja a  $\text{CO}_2$ -fixációban fontos szerepet játszó Rubisco-aktiváz enzimet (Barta és mtsai., 2010) és a PSII donor oldalán elhelyezkedő OEC-t. Pontosabban, hőkezelés hatására az OEC külső fehérjei (pl. PsbO) és a két Mn-ion leválik a komplexről (Nash és mtsai., 1985; Enami és mtsai., 1994; Yamane és mtsai., 1998; Barra és mtsai., 2005). Ez leválás maga után vonja a  $\text{Cl}^-$ -ion távozását (Popelkova és Yocum, 2011) és végül a  $\text{Ca}^{2+}$ -ion elvesztését (Bricker és Frankel, 2008), ami végül az OEC teljes inaktivációját eredményezi. Hőstressz hatására a PSII D1 és D2 fehérjei is degradálódhatnak (De Las Rivas és Barber, 1997; Yoshioka és mtsai., 2006).

Természetes körülmények között a hőstressz sokszor együtt jár a fénystresszel. Ez a két stresszfaktor együttesen a PSII inaktivációját és fotooxidációját okozhatják növényekben (Havaux, 1993) és korallokban (Abrego és mtsai., 2008). Ha valamilyen módon, pl. hőstresszel – a fent leírt módon – inaktiválódik az OEC, a PSII nagyon érzékeny lesz a megvilágításra a csökkent elektronellátottság miatt. Ennek eredményeként a reakciócentrumban erősen oxidáló komponensek,  $P_{680}^{+}$ ,  $Tyr_Z^{+}$ , szuperoxid (Chen és mtsai., 1995) vagy hidroxilgyökök (Spetea és mtsai., 1997) halmozódnak fel, aminek következtében a D1 fehérje degradálódik, ami végső soron a PSII reakciócentrum teljes inaktivációjához vezethet (Callahan és mtsai., 1986; Blubaugh és Cheniae, 1990; Jegerschöld és Styring, 1996). Ezt a folyamatot donor oldal által indukált fotoinhibíciónak nevezzük.

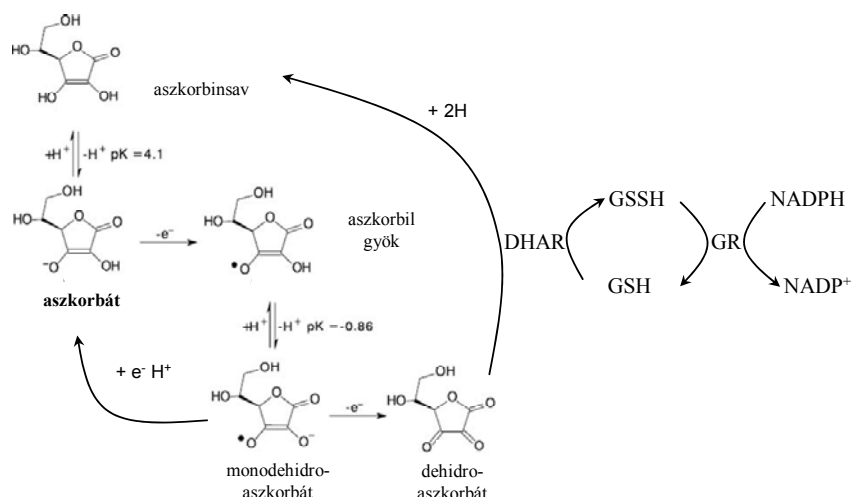
#### 2.4. Az aszkorbát mint lehetséges PSII elektrondonor

Korábban megfigyelték, hogy ha rövid idejű hőkezeléssel (50 °C, 40 s vízfürdőben) inaktiválják a vízbontó komplexet árpa (*Hordeum vulgare*) levélben, akkor a vízmolekulák helyett nagy mennyiségben jelenlévő, alternatív elektrondonorok juttatnak elektronokat a PSII-höz *in vivo* (Tóth és mtsai., 2007a). Tudjuk azt, hogy ha az OEC teljesen inaktív, számos vegyület képes elektrondonorként viselkedni *in vitro*, pl. aszkorbát,  $Mn^{2+}$ ,  $NH_2OH$ , TMPD (Katoh és San Pietro, 1967; Yamashita és Butler, 1968). Mano és mtsai. (1997) kimutatták, hogy izolált tilakoidmembránban kémiai kezelés (Tris-mosás) után a difenil-karbazid (DPC) és az aszkorbát alternatív elektrondonorként viselkednek, folyamatos elektrontranszportot biztosítva védik a PSII reakciócentrumot a fotoinhibíció káros hatásaival szemben. Az is ismert, hogy ha a PSII aktív OEC-vel rendelkezik, az aszkorbát nem hatékony elektrondonor (Hauska és mtsai., 1977; Mano és mtsai., 2004). Ezen kísérletek (Katoh és San Pietro, 1967; Yamashita és Butler, 1968; Mano és mtsai., 2004) alapján az aszkorbát ígéretes alternatív elektrondonornak tűnt *in vitro* és *in vivo* körülmények között is.

Az aszkorbátot (C-vitamin) Szent-Györgyi Albert fedezte fel 1920-ban és az ezzel kapcsolatos kutatásainak elismeréseként 1937-ben Nobel-díjat kapott. Az aszkorbát a növényi sejtekben mindenütt előforduló multifunkcionális szereppel rendelkező metabolit. A C3-as növények kloroplasztizának aszkorbáttartalma körülbelül 25-50 mM (Eskling és Åkerlund, 1998; Smirnoff, 2000), míg a lumené feltehetően kb. 4 mM (Foyer és Lelandais, 1996). Fontos feladata a reaktív oxigéngyökök semlegesítése (Asada, 2006), de szerepet játszik a redox jelátvitelben, a sejtosztódásban, a sejtfal bioszintézisében, a génexpresszióban és egyes enzimek aktivitásának szabályozásában is (De Tullio és mtsai., 1999; Potters és mtsai., 2002; Shao és mtsai., 2008; Tóth és mtsai., 2013). A xantofill-ciklusban mint a violaxantin-

deepoxidáz kofaktora vesz részt, így szerepe van a nem-fotokémiai kioltásban (NPQ) is. A violaxantin-deepoxidáz a tilakoidmembrán lumenében helyezkedik el és a violaxantin zeaxantinná való átalakításában vesz részt. A zeaxantin mennyiségének megnövekedése a PSII antennában elősegíti az elnyelt fényenergia hővé való átalakulását, így stressz körülmények között védi a PSII-t a feleslegben elnyelt fényenergia káros hatásaitól (Mohanty és Yamamoto, 1995; Demming-Adams és mtsai., 1996; Niyogi, 1999; Morosinotto és mtsai., 2003).

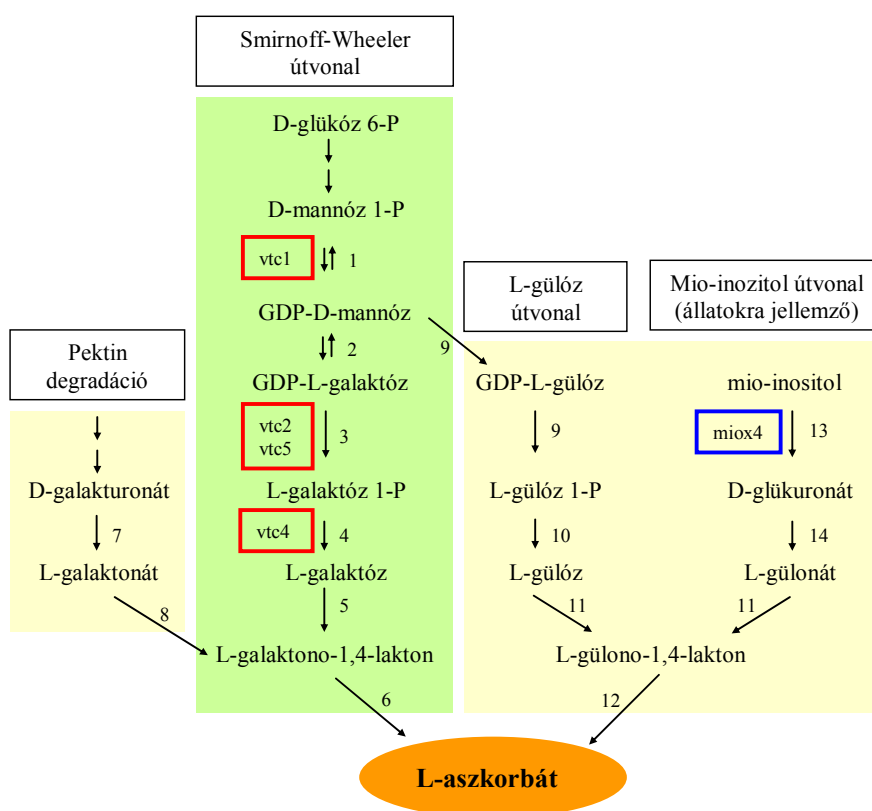
Az aszkorbát gyenge savként fordul elő a növényi sejtekben: fiziológiai körülmények között az anionos formája a domináns ( $\text{AscH}^-$ ,  $\text{pK} = 4.1$ ). A lumenben az első oxidációs folyamat során aszkorbátból monodehidroaszkorbát (MDHA)-gyök keletkezik (7. ábra). Az MDHA gyök spontán módon diszproporcionál aszkorbáttá és dehidroaszkorbáttá (DHA), az utóbbi valószínűleg diffúzióval jut át a sztrómába, ahol ismét aszkorbáttá redukálódik a glutation-reduktáz (GR) és a dehidroaszkorbát-reduktáz (DHAR) enzim segítségével. Az aszkorbát feltehetően, még nem azonosított transzporterek révén, visszajut a lumenbe (Mano és mtsai., 2004; Tóth és mtsai., 2013).



**7. ábra.** Az aszkorbát kloroplasztisban történő reciklizációs folyamata (DHAR: dehidroaszkorbát-reduktáz GSH-glutation, GSSH-glutation-diszulfid, GR-glutation-reduktáz). Az ábra Smirnov (2011) cikke alapján készült.

Számos aszkorbát-bioszintézis útvonalat azonosítottak és írtak le az utóbbi időben. A növényekben az aszkorbát szintézise elsősorban a Smirnov-Wheeler út (Wheeler és mtsai., 1998) szerint történik (8. ábra). Ez az út az D-glükózból kiindulva a D-mannóz és L-galaktoz különböző formáin keresztül vezet el az aszkorbát molekuláig. Az utolsó oxidációs lépés, az L-galakto-1,4-lakton aszkorbáttá alakulása már a mitokondriumban megy végbe (Miller és mtsai., 2003). A bioszintézis útvonalban szereplő egyes kulcsfontosságú enzimek génjeit

genetikai módosítással inaktíválva aszkorbát-hiányos mutánsok hozhatók létre. Ilyen például GDP-D-mannóz pirofoszforiláz, amelyet a VTC1 gén (Conklin és mtsai., 1996), GDP-L-galaktóz-foszforiláz guaniltranszferáz, amelyet a VTC2 és VTC5 gének, L-galaktóz-1-foszfát foszfatáz, amelyet a VTC4 gén kódol (Conklin és mtsai., 2000). Ezen mutánsok felhasználásával vizsgálni tudjuk az aszkorbát lineáris elektrontranszportban betöltött szerepét és élettani jelentőségét.



**8. ábra.** Az aszkorbát bioszintézisének útvonalai. 1. GDP-mannóz pirofoszforiláz (GMPase) – *vtc1* gén kódolja, 2. GDP-mannóz epimeráz (GME), 3. GDP-1-galaktóz foszforiláz (GPP) – *vtc2* és *vtc5* gén kódolja, 4. L-galaktóz 1P foszfatáz (GPP) – *vtc4* gén kódolja, 5. L-galaktóz dehidrogenáz, 6. L-galaktono-1,4-γ-lakton dehidrogenáz (GaLDH), 7. galakturonát reduktáz (GalUR), 8. aldono-laktonáz, 9. foszfodiészteráz, 10. cukor foszfatáz, 11. L-gulonó dehidrogenáz, 12. L-gulon-1,4-γ-lakton oxidáz (GuLO), 13. mio-inositol oxigenáz (MIOX) – *miox4* gén kódolja, 14. D-glükuronát reduktáz. Az ábra Locato és mtsai. (2013) cikke alapján készült. A rendelkezésre álló legfontosabb mutánsokat az ábrán bekeretezve jelöltem.

### 3. CÉLKITŰZÉS

PhD tanulmányaim kezdetekor (2009) ismert volt, hogy ha a PSII vízbontó komplexe valamilyen módon, pl. hőstressz által sérül, a vízmolekulák helyett nagy mennyiségben jelen lévő, alternatív elektrondonorok juttatnak elektronokat a második fotokémiai rendszerhez (Tóth és mtsai., 2007a), és feltételeztük, hogy ez az elektrondonor az aszkorbát. Ezek alapján célul tűztük ki:

- Az alternatív elektrondonor azonosítását
- Ezen alternatív elektrontranszport-folyamat lehetséges élettani szerepének vizsgálatát.

*Chlamydomonas reinhardtii* sejtekben kénmegvonás hatására jelentősen csökken a PSII oxigéntermelése, és az így létrejött anaerob körülmények között a fennmaradó PSII aktivitásból és a keményítőbontásból származó elektronok részben hidrogéntermelésre fordítódnak. Elképzelhetőnek tartottuk, hogy a hidrogéntermelés serkenthető az alternatív elektrondonorok által, és ennek igazolására célul tűztük ki:

- Az aszkorbát elektrontranszportra és hidrogéntermelésre gyakorolt hatásának vizsgálatát *C. reinhardtii* sejtekben.



## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. A növények és a *Chlamydomonas reinhardtii* törzsek nevelése

#### *A növények nevelése*

A munkánk során nyolc-tíz hetes vad típusú (Columbia, Col-0), aszkorbát-hiányos (*vtc2*, Conklin és mtsai., 2000) és aszkorbát-túlermelő (*miox4*; Lorence és mtsai., 2004) *Arabidopsis thaliana* (14A ábra) növényeket vizsgáltunk. Az *A. thaliana* növényeket növénynevelő kamrában, 8/16 óra fény/sötét ciklus mellett neveltük. A fényperiódus alatt a fotonáram-sűrűség  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a hőmérséklet  $24^\circ\text{C}$ , míg a sötétperiódus alatt  $18^\circ\text{C}$  volt.

A *vtc2* gén a GDP-l-galaktóz foszforiláz enzimet kódolja, ami a Smirnov-Wheler aszkorbát-bioszintézis útvonalban játszik fontos szerepet (8. ábra). A *vtc2-1* mutánsban a *vtc2* gén 5. intronjában történt pontmutáció következtében a *vtc2* transzkript szintje nagymértékben lecsökken. A *vtc2-3* mutánsban a pontmutáció következtében a GDP-l-Gal foszforiláz enzim Ser290 aminosavát Phe helyettesíti, aminek következtében az enzim foszfátkötő képessége és aktivitása drasztikusan lecsökken (Jander és mtsai., 2002; Linster és Clarke, 2008). Az aszkorbát-tartalom a vad típushoz képest *vtc2-1* mutánsban 15%-os, míg a *vtc2-3* esetében kb. 30-50%-os (Conklin és mtsai., 2000; Dowdle és mtsai., 2007; Colville és Smirnov, 2008; Linster és Clarke, 2008). Az aszkorbát-bioszintézis egyik alternatív útvonalában (8. ábra) a mio-inozitol (MI) D-glükuronáttá való átalakulását a MI-oxigenáz (MIOX) enzim katalizálja. A *miox4* egy olyan konstitutív túlermelő mutáns, amelyben a levelek aszkorbát-tartalma 2-3-szor nagyobb a vad típushoz képest (Lorence és mtsai., 2004).

#### *Chlamydomonas* törzsek nevelése

Az aszkorbát hidrogéntermelésre gyakorolt hatását 7 különböző, a szakirodalomból kiválasztott, hidrogéntermelésre használt *C. reinhardtii* törzsön vizsgáltuk. A CC-124, CC-849, CC-400, CC-409, CC-125 törzsek a *Chlamydomonas* kutatóközpontból (*Chlamydomonas* Resource Center, University of Minnesota, USA) érkeztek, az 1A mutáns törzset (L159I-N230Y; Johanningmeier és Heiss, 1993; Preiss és mtsai., 2001; Scoma és mtsai., 2012) Dr. Alberto Scoma bocsátotta rendelkezésünkre. Az általunk vad típusként megnevezett *C. reinhardtii* törzs eredetileg a Kolorádói Egyetemről származik (Colorado School of Mines, Golden, USA) és CC-124-ként került az intézetünkbe, azonban a jelentős morfológiai és élettani eltérések miatt új névvel láttuk el (S-01, Nagy és mtsai., 2015).

A sejteket Tris-acetát-foszfát (TAP) szilárd táptalajon vagy tápoldatban neveltük,  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűségen,  $24^\circ\text{C}$ -on, alganevelő kamrában. A TAP tápoldat a Tris-acetát-foszfát összetevőikön kívül tartalmaz még mikroelemeket (EDTA,  $\text{ZnSO}_4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnCl}_2\text{4H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2\text{6H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4\text{5H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}\text{4H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4\text{7H}_2\text{O}$ ; Hutner és mtsai., 1950) valamint  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$  komponenseket (Gorman és Levine, 1965). A kísérletekhez a sejteket steril körülmények között átoltottuk 250 ml-es lombikba, ami 50 ml TAP tápoldatot tartalmazott. A kultúrát ezután folyamatos fényben ( $80\text{--}100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűség),  $24^\circ\text{C}$ -on, 100 rpm-en rázatva tartottuk. Háromnapos nevelés után a kultúrát többszöri centrifugálással kénmentes TAP tápoldatba (Harris, 1989; Melis és mtsai., 2000) helyeztük át (a fent leírt alkotók közül a kén tartalmúakat klorid tartalmúakra cseréltük:  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2\text{2H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_2\text{4H}_2\text{O}$ ). A centrifugálás Sorval centrifugával történt  $1000 \times g$ -értékkel,  $20\text{--}24^\circ\text{C}$ -on, 5 percig. A centrifugálás után eltávolítottuk a felülúszót, kénmentes tápoldatban felfuszpendáltuk a sejteket, majd ismét lecentrifugáltuk, és ezt a lépést négyszer megismételtük. A klorofilltartalmat  $8 \mu\text{g}$  klorofill  $\text{ml}^{-1}$ -re állítottuk be, ezután a 30 ml kénmentes tápoldatban lévő kultúrát a gumiszeptummal és alumíniumgyűrűvel légmentesen zárható, 100 ml-es hypovial (szérum) üvegbe helyeztük, amiben a hidrogéntermelés történik. Minden lépés steril körülmények között történt. Az üveg légterét nitrogéngázra cseréltük, és a naponta termelődött  $\text{H}_2$  mennyiségét gázkromatográfiás mérésekkel határozzuk meg. A kultúrát továbbra is rázatva tartottuk, ugyanolyan paraméterek mellett, mint amikor kén tartalmazó tápoldatban voltak.

## 4.2. Módszerek

### 4.2.1. A kísérletek során használt kezelések

#### 4.2.1.1. Hő- és fénykezelések

##### *Hőkezelés*

*A. thaliana* levelek vízbontó komplexének teljes inaktivációjához magas hőmérsékletű rövid ideig tartó ( $49^\circ\text{C}$ , 40 másodperc), vagy alacsonyabb hőmérsékletű viszonylag hosszabb ideig tartó ( $40\text{--}41^\circ\text{C}$ , 15 perc), vízfürdőben történő hőkezelést végeztünk. Az OEC részleges inaktiválásához  $38^\circ\text{C}$ , 15 percig tartó vízfürdős hőkezelést használtunk. A kezelés után a leveleket szobahőmérsékletű vízben lehűtöttük. A teljes folyamat sötétben zajlott.

*C. reinhardtii* sejtek esetében a hőkezelés  $52^\circ\text{C}$ -on, 1 percig illetve  $45^\circ\text{C}$ -on, 5 percig tartott és vízfürdőben, sötétben történt, majd a kezelt kultúrát  $25^\circ\text{C}$ -os vízfürdőben szobahőmérsékletűre lehűtöttük.

### Fénykezelés

Hőkezeléssel inaktivált OEC-vel rendelkező *A. thaliana* leveleket megvilágításnak tettük ki. A fénykezelés folyamatos fényben 4 órán keresztül történt, a fotonáram-sűrűség  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  volt. A helyreállást vizsgáló kísérletekben a hőkezelés után  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűségű megvilágítást használtunk 24 órán keresztül. Mindkét fénykezelés  $24^\circ\text{C}$ -on történt.

Sorozatos, reakciócentrumonként egyetlen töltésszétválasztást indukáló telítési fényimpulzussal (SSTF) történő fénykezelést is alkalmaztunk, amit  $3 \mu\text{s}$  hosszúságú fényimpulzussal értünk el. A két egymást követő fényimpulzus közötti sötét periódus hossza 100, 200 és 500 ms volt (azaz 10, 5 vagy 2 Hz frekvenciájú fényimpulzus sorozatot adtunk), a kezelés hossza pedig 10 perctől 1 órán át tartott.

#### 4.2.1.2. Kémiai kezelések

##### *Aszkorbát- és difenilkarbazid-kezelés*

Az aszkorbátot Na-aszkorbát oldat formájában jutattuk a mintákhoz. Az aszkorbátkezelés *A. thaliana* levelek esetében 2 órán keresztül, fényen ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűség), aszkorbátoldatban (20 mM) való úsztatással történt. A *vtc2* levelek 1 mM difenilkarbaziddal (DPC; mesterséges PSII elektrondonor) történő kezelésekor ugyanígy jártunk el. A Na-aszkorbátot és a DPC-t desztillált vízben oldottuk fel.

A *C. reinhardtii* törzsek esetében az aszkorbátoldatot (10 mM) közvetlenül a kénmentes tápoldatba való áthelyezés után adtuk a kultúrához.

##### *DCMU-kezelés*

A levelek esetében  $200 \mu\text{M}$ -os DCMU oldatban úsztatásos módszerrel kezeltük a mintákat, teljes sötétségben, 2 órán keresztül.

Algakultúra esetében a DCMU-kezelés a kénmegvonással egyidőben (0.nap) vagy a kénmegvonás második napján történt. A DCMU-t  $20 \mu\text{M}$  koncentrációban alkalmaztuk.

#### 4.2.2. Mérési módszerek

##### 4.2.2.1. A klorofilltartalom meghatározása

Az *A. thaliana* levelek klorofilltartalmának meghatározásakor az ismert súlyú levélkorongokat (kb. 10 mg) dimetilformamidban (DMF) áztattuk 24 órán át sötétben,  $4^\circ\text{C}$ -on. A levélkorongok fehér színűek lettek, a klorofill a folyadékfázisba került. A

klorofilltartalmat ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) 663 és 646 nm hullámhosszon spektrofotometriás módszerrel mértük és Porra és mtsai.-nak módszere alapján számoltuk ki (Porra és mtsai., 1989, 2002).

$$[\text{Klorofill a} + \text{b}] = 17.67E^{646.8} + 7.12E^{663.8}$$

*C. reinhardtii* sejtek esetében a pigmentkivonás 10 percig 80%-os acetonban való inkubálással történt sötétben. Centrifugálást követően megmértük a felülúszó abszorpcióját 645 és 663 nm-en és meghatároztuk a minta klorofilltartalmát ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; Porra és mtsai., 1989, 2002).

$$[\text{Klorofill a} + \text{b}] = 17.76 E^{646.6} + 7.34 E^{663.6}$$

#### 4.2.2.2. Az aszkorbáttartalom meghatározása

A vad típusú, aszkorbát-hiányos és aszkorbát-túltermelő *A. thaliana* levelek aszkorbáttartalmát spektrofotometriás módszerrel, az aszkorbát 265 nm-es abszorpciója alapján határoztuk meg. A kb. 30-40 mg mennyiségű levélkorongot 1 ml 6% triklórecetsavat tartalmazó kálium-foszfát pufferben (50 mM, pH 7) elhomogenizáltuk, majd centrifugálás (11500 x g, 20 percig, 4 °C-on) után a felülúszóból meghatároztuk az aszkorbáttartalmat a következő módon: 1. 950  $\mu\text{l}$  50 mM-os kálium-foszfát pufferhez hozzáadtuk 50  $\mu\text{l}$ -t a felülúszóból, amely aszkorbátot és dehidroaszkorbát egyaránt tartalmazott és megmértük az abszorpcióját (A1), 2. az 1-es mintához hozzáadtunk még 5  $\mu\text{l}$  aszkorbát-oxidázt (1000 U  $\text{ml}^{-1}$ , ezáltal az aszkorbát dehidroaszkorbáttá alakul) majd 1 perc után ismét megmértük az abszorpció értékét (A2). A minta aszkorbáttartalmát az A1 és az A2 érték különbségéből számoltuk ki a Beer-Lambert törvény alapján ( $\epsilon=18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 3. az 50  $\mu\text{l}$  felülúszót tartalmazó kálium-foszfát pufferhez 20  $\mu\text{l}$  ditiotreitolt (DTT) adtunk (100 mM-os törzsoldatból, hatására a dehidroaszkorbát redukálódik) és megmértük az abszorpciót (A3); a minta dehidroaszkorbát mennyiségét az A3 és az A1 érték különbsége (Beer-Lambert törvény) alapján kaptuk meg.

Az aszkorbáttal kezelt és kontroll *C. reinhardtii* S-01 és CC-124 törzsek aszkorbáttartalmát a kénmegvonás időtartama alatt (6 napig) HPLC méréssel határoztuk meg. A mintákról ( $2 \times 10^7$  sejt vagy 5 ml 8  $\mu\text{g}$  klorofill  $\text{ml}^{-1}$  kultúra) centrifugálás útján (11 500 x g, 5 perc, szobahőmérsékleten) eltávolítottuk a kénmentes TAP tápoldatot. A sejteket ismét kénmentes TAP tápoldatban felfuszpendáltuk, majd lecentrifugáltuk, ezt a mosási lépést kétszer megismételtük. Ezt követően a sejteket feltárási pufferbe helyeztük, amely 2 mM EDTA-t, 5 mM DTT-t és 5%-ban orto-foszforsavat tartalmazott. A hatékonyabb feltárási érdekében a felfuszpendált sejteket üveggyönggyel (212-300  $\mu\text{m}$  átmérőjű) együtt

30 másodpercig erős rázatásnak tettük ki (Vortex). Miután a sejtek barna színűvé váltak (kb. 2 perc, szobahőmérsékleten) ismét lecentrifugáltuk a mintákat (14 100 x g, 30 perc, 4°C-on), így hozzájutottunk az aszkorbátot tartalmazó tiszta, üveggyöngytől és sejttörmeléktől mentes felülúszóhoz. Az így kapott mintát folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és a HPLC mérésekig -80 °C-on tároltuk.

Az aszkorbát tartalmú mintából 25 µl-t injektáltunk az Agilent 1100 típusú (Agilent, Waldbronn, Germany) diódasoros detektorral rendelkező HPLC készülékbe. Az aszkorbát háttérkomponensektől való elválasztása a YMC-Pack ODS-A 250x4.6 mm-es kolonnán történt előtétkolonnával. Eluensként 50 mM-os  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=2.5) puffert használtunk, ami 1 ml/min sebességgel áramlott, a kolonnatér hőmérséklete 30 °C volt az elválasztás során. A kolonnán esetlegesen fennmaradó komponensek eltávolítására 40%-os acetonitrilt használtunk. A detektálás az aszkorbát UV elnyelése alapján történt 245 nm-en. A sejten belüli aszkorbátkoncentrációt (mM) a sejtszám és a sejttérfogat alapján határoztuk meg. A sejszámot a Z2™ Coulter Counter® (Beckman Coulter) készülék segítségével állapítottuk meg. A sejttérfogat meghatározáshoz alapul szolgált, hogy egy darab *C. reinhardtii* sejt becsült térfogata 140 femtoliter (Craigie és Cavalier-Smith, 1982, Urzica és mtsai., 2012).

#### 4.2.2.3. A keményítőtartalom meghatározása

A keményítőtartalmat kénmegvont és anaerob körülmények között tartott, 10 mM aszkorbáttal kezelt és kontroll S-01 és CC-124-es *C. reinhardtii* törzsekben határoztuk meg. 6 napon át minden nap kivettünk 1 ml mintát a 30 µg ml<sup>-1</sup> klorofilltartalmú, hidrogéntermelő kultúrából. A sejtek feltárásakor centrifugálással (12 000 x g, 4 min) eltávolítottuk a kénmentes TAP tápoldatot, majd ezt követően a sejteket kétszer metanolban, majd kétszer 0,1 M Na-acetát pufferben (pH 4,5) felszuszpendáltuk és lecentrifugáltuk, végül a 0,1 M-os Na-acetát pufferben lévő mintákhoz üveggyöngyöt adtunk 1:1 arányban, és 4 x 1 percig homogenizáltuk (Mini Beadbeater típusú homogenizátor). Az így kapott felülúszót vízfürdőben 15 percig főztük, majd lehűtöttük szobahőmérsékletűre, és hozzáadtunk 3 egység aminoglükózidázt, ami a minta keményítőtartalmát kb. 16 óra alatt, 55 °C-on glükózzá hidrolizálta. A glükóztartalmat vércukormérő készlettel határozzuk meg (Fluitest® GLU kit, Analyticon® Biotechnologies AG).

#### 4.2.2.4. A tilakoidmembránok izolálása

A borsólevelek termolumineszcenciás mérései izolált tilakoidmembránokon történtek. Első lépésként a sötétadaptált hőkezelt és kezeletlen leveleket elhomogenizáltuk 40 mM-os Hepes pufferben (pH 7,5), ami tartalmazott még 0,4 M szacharózt, 1% (w/v) BSA-t, 5 mM

MgCl<sub>2</sub>-t, 15 mM NaCl-t és 2 mM Na<sub>2</sub>-EDTA-t. A homogenizátumot négy réteg mull-lapon történő átszűrés után lecentrifugáltuk (3000 x g, 5 percig), a kapott üledéket felszuszpendálás után ismét lecentrifugáltuk. Az így kapott membránszuspenziót tartalmazó üledéket 40 mM Hepes, 0,4 M szacharóz, 5 mM MgCl<sub>2</sub>-t, 15 mM NaCl-t tartalmazó pufferben (pH 7,5) felszuszpendáltuk. Az izolált tilakoidmembrán-szuspenzió klorofilltartalmát meghatároztuk (Porra és mtsai., 1989). A mérésekhez 200 µg klorofill ml<sup>-1</sup> mintát használtuk. A mérésekig sötétben és jégben tartottuk a tilakoidmembrán-szuspenziót.

#### 4.2.2.5. Gyors klorofill-a fluoreszcencia tranziensek (OJIP) mérése

Az OJIP tranziensek mérése szobahőmérsékleten történt a Handy-PEA készülék (Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, Egyesült Királyság) egy speciális verziójának segítségével, amellyel a fényimpulzusok minimális hossza 300 µs a szokásos 30 ms helyett. A 15 percig sötétadaptált leveleket levélcsipeszbe tettük, míg a tilakoidmembrán-szuspenziót (20 µg klorofill ml<sup>-1</sup>) és a sötétadaptált *C. reinhardtii* kultúra (8 µg klorofill ml<sup>-1</sup>) 5 ml-jét Whatmann szűrőpapírra (GF/C) rászűrve helyeztük a levélcsipeszbe. A minta gerjesztése vörös (650 nm hullámhosszúságú) fénnel történt, általában 3500 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fotonáram-sűrűséggel. A mérőfejben lévő három darab vörös LED-ből jövő fény a minta felszínén egy 5 mm-es átmérőjű körben fókuszálódik. A gerjesztő fény és a fluoreszcencia elválasztása fényszűrő segítségével történik. Az OJIP görbe első megbízható pontja a 20 µs-nál mért érték, ezt a pontot tekinthetjük az F<sub>0</sub> értéknek. A Handy-PEA készülék 0 és 0,3 ms között 10 µs-onként méri a fluoreszcencia intenzitását, 0,3 és 3 ms között 100 µs-onként, 3 és 30 ms között 1 ms-ként, 30 és 300 ms között 10 ms-ként, 300 és 3000 ms között 100 ms-ként és végül s-ként mér, ha a mérés esetleg hosszabb, mint 3 s. Az általunk végzett mérések hossza 5 s vagy 5 ms. A két 5 ms-ig tartó fényimpulzus közötti sötét periódus hossza 2,3; 9,6; 16,9; 31,5; 38,8; 53,4; 75,3; 100; 200 és 500 ms volt.

#### 4.2.2.6. Az ETR, NPQ és qE paraméterek meghatározása

Az ETR, NPQ és qE paramétereket Dual-PAM 100 készülék (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Németország) segítségével határoztuk meg. A mérés előtt a mintákat legalább 1 órán át sötétadaptáltuk. Az F<sub>0</sub> értéket 20 Hz modulációjú mérőfénnel határoztuk meg, F<sub>m</sub>-et sötétadaptált állapotban, F<sub>m</sub>' értéket aktinikus vörös fénnel (430 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fotonáram-sűrűség) történő megvilágítás alatt határoztuk meg telítési (5500 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fotonáram-sűrűség) fényimpulzusok alkalmazásával. Az F<sub>m</sub>"-t az aktinikus megvilágítást követő 2 percig tartó sötétadaptáció után mértük meg telítési fényimpulzussal.

Az elektrontranszport sebességet (ETR), a nem fotokémiai kioltást (NPQ) és az NPQ pH grádiensből ( $\Delta pH$ ) függő gyorsan relaxálódó komponensét (qE) a következő képletek alapján határoztuk meg (Miyake és mtsai., 2005):

$$ETR = Y(II) \times PPFD \times p \times dII \text{ (White és Critchley, 1999)}$$

$Y(II)$  – a PSII effektív hatásfoka ( $Y(II) = (F_m' - F') / F_m'$  (Genty és mtsai., 1989))

$F'$  – a fluoreszcencia szintje aktinikus fényben

PPFD – a fényáram sűrűség

$p$  – abszorpció együttható, értéke 0,8

$dII$  – a levél által elnyelt fény PSII-re eső hányada, értéke 0,5

$$NPQ = F_m - F_m' / F_m'$$

$$qE = NPQ - (F_m - F_m'' / F_m'')$$

#### 4.2.2.7. $P_{700}$ oxidációs-redukciós kinetikai mérések

A fényindukált 820 nm-es abszorpcióváltozások a  $P_{700}$  és PC redox állapotának változását mutatja és a Dual-PAM 100 készülék segítségével detektáltuk sötétadaptált *A. thaliana* leveleken. A minta gerjesztése folyamatos vörös fényvel ( $5000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűség), a  $P_{700}$  és PC redoxállapotának követése pedig 830 nm hullámhosszon 870 nm-re nullázva, 60  $\mu\text{s}$  időfelbontással történik. 5 ml 8  $\mu\text{g}$  klorofill  $\text{ml}^{-1}$  klorofilltartalmú *C. reinhardtii* kultúrát 15 perces sötétadaptáció után Whatman szűrőpapírra rászűrve, két mikroszkóp fedőlemez közé helyezve mértük 830 és 870 nm-en, 1 ms időfelbontással.

#### 4.2.2.8. Termolumineszcencia mérések

A TL mérések a PSII-n belüli rekombinációs folyamatokról adnak információt, és használhatók például a vízbontó komplex aktivitásának jellemzésére. Ezen mérésekhez egy házilag készített TL készüléket (Wiessner és Demeter, 1988) használtunk. A készülék mintatartójában a sötétadaptált tilakoidmembrán-szuszpenziót (0,5 ml, 200  $\mu\text{g}$  klorofill  $\text{ml}^{-1}$ ) -20 °C-on 1 SSTF-vel megvilágítottuk, majd tovább hűtöttük a mintát -40 °C-ra. A leveleken és a *C. reinhardtii* kultúrán (0,3 ml, 8  $\mu\text{g}$  klorofill  $\text{ml}^{-1}$ ) történő méréseknél a megvilágítás kb. 0 és 4 °C-on volt, illetve *C. reinhardtii* sejteknél dupla SSTF-t alkalmaztunk. A mérés során a mintákat 70 °C-ig melegítettük fel, 20 °C  $\text{min}^{-1}$  fűtési sebességgel.

#### 4.2.2.9. 515 nm-es elektrokróm abszorpciótranziens mérések

Az elektrokróm abszorpció változások követésével a tilakoidmembrán integritását (ionáteresztő képességét, elektromos permeabilitását) vizsgáltuk. Az 515 nm-en lezajló

abszorpcióváltozásokat egy házilag készített berendezéssel mértük (Büchel és Garab, 1995). Az abszorpcióváltozást 3  $\mu$ s idejű SSTF-sel indukáltuk és a kinetikát 100  $\mu$ s időfelbontás mellett mértük; 32 görbét átlagoltunk és a mérések között 500 ms időintervallum volt.

#### 4.2.2.10. Hidrogén- és oxigéngáz meghatározása gázkromatográfiával

A *C. reinhardtii* kultúra által termelt  $H_2$  és  $O_2$  mennyiségének meghatározására gázkromatográfiás méréseket végeztünk. A kultúrát tartalmazó szérüműveg (lásd 4.1. fejezet) légteréből Hamilton 1750 RN típusú mikrofecskendővel 500  $\mu$ l-t fecskendeztünk a gázkromatográfba. A légtérkomponensek meghatározása egy hővezető képességi detektorral (TCD) felszerelt Agilent 6890N típusú gázkromatográfal történt. A elválasztáshoz Molesieve 5 Å (30 m x 0,53 mm x 530  $\mu$ m) kolonnát használtunk, argon vivőgáz alatt, 16,9 ml/perc áramlási sebességgel és 60 °C kolonna tér hőmérséklet mellett. A detektor hőmérséklete 160 °vC volt.

#### 4.2.2.11. *In vitro* hidrogenáz aktivitás mérések

A kénmegvonás második napján mértük a *C. reinhardtii* sejt kultúra (8  $\mu$ g klorofill  $ml^{-1}$ ) *in vitro* hidrogenáz aktivitását. A mérés 13 ml térfogatú szérüművegben történt, ami 4 ml reakcióelegyet tartalmazott. A 1,9 ml 100 mM-os foszfát puffert (pH 6,8; 100 mM  $K_2HPO_4$  + 100 mM  $KH_2PO_4$ ), 760  $\mu$ l desztillált vizet, 100  $\mu$ l 10%-os Triton X-100-at és 40  $\mu$ l 1 M-os metilviologént tartalmazó üveg légterét nitrogén gázra cseréltük. Ezt követően fecskendő segítségével a szérüművegbe jutattunk még 400  $\mu$ l 1 M-os anaerob nátrium-ditionitot, amelynek hatására a reakcióelegy sötétlila színűre változott, majd a 800  $\mu$ l anaerob (2 napos) sejt kultúra (6  $\mu$ g klorofill 4 ml reakcióelegyben) hozzáadása után ismételtén az üveg légterét nitrogéngázzal átfúvattuk. A mintákat 37 °C-os vízfürdőbe helyeztük majd 15, 30, 45, 60, 75, 90 és 120 percenként gázkromatográfal mértük a termelt  $H_2$  mennyiségét (Scoma és mtsai., 2012).

#### 4.2.2.12. Western blot analízis

A PSII fehérjeösszetételének mennyiségi kimutatására western blot analízist használtunk. A 3,1  $cm^2$  területű *A. thaliana* levélkorongokat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk majd 500  $\mu$ l kétszeres töménységű Laemmli pufferben (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 0,1% brómfenol kék, 10% glicerol, desztillált víz, 200 mM DTT, 5 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid) elhomogenizáltuk. A homogenizátumot



először 90 °C-on 5 percig, majd 37 °C-on 20 percig inkubáltuk. A minta fehérjetartalmát 15%-os Tris/glicin SDS gélen választottuk el. Elválasztás után a gélből a fehérjéket nitrocellulóz membránra vittük át, metanol alapú transzfer pufferben (25 mM Tris, 192 mM glicin, 20% metanol). Transzferálás után a nitrocellulóz membránt 5% tejport tartalmazó 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 8,0-as pufferben (TBST) majd ezt követően TBST pufferben kihígított elsődleges ellenanyag (PsbA (D1), PsbC (CP43), PsbO (33 kD-os OEC fehérje); Agrisera AB) jelenlétében inkubáltuk egy-egy órát. A membránokat háromszor 5 percig tartó TBST pufferben törénő mosás után TBST pufferben 1/5000 arányban kihígított torna-peroxidázzal konjugált kecske IgG ellenanyaggal kezeltük 1 órán át. Az immunjelölt fehérjéket ECL peroxidáz szubsztrátot tartalmazó oldattal (GE Healthcare Bio-Sciences) inkubáltuk 5 percig, enzimműködést kísérő kemilumineszcenciát Hyperfilm ECL filmen (GE Healthcare Bio-Sciences) detektáltuk. Az előhívott filmet Epson Perfection V700 fotó szkennelrel digitalizáltuk, és a kapott képet Gel-Pro analyzer programmal denzitometráltuk.

#### 4.2.2.13. Statisztikai elemzés

A bemutatott eredmények minden esetben legalább három független kísérlet méréseiből számolt átlagok, szórásként pedig az átlag szórás (SE) van feltüntetve. A statisztikai elemzést Student-féle t-tesztel vizsgáltuk. A szignifikancia szintet az alábbiak alapján állapítottuk meg: <sup>+</sup> p<0,1; \* p<0,05; \*\* p<0,01;\*\*\* p<0,001.

## 5. EREDMÉNYEK

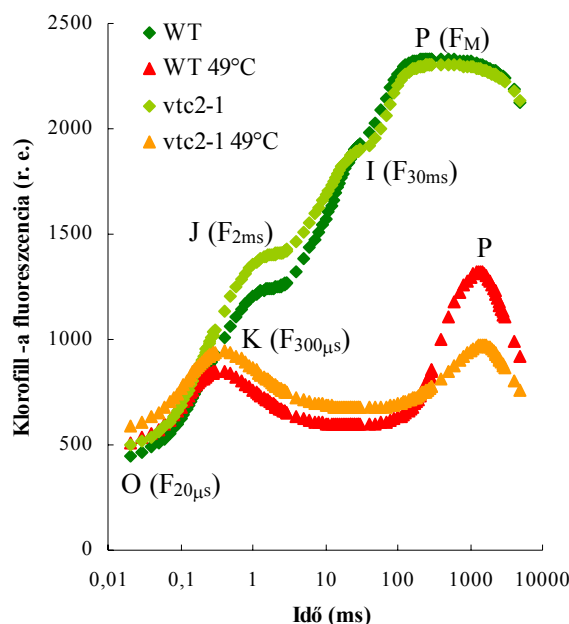
### 5.1. Az alternatív elektrondonor azonosítása

#### 5.1.1. Az aszkorbát a PSII alternatív elektrondonora

A vízbontó komplex a fotoszintetikus elektrontranszportlánc egyik legsérülékenyebb komponense. Bizonyított, hogy ha a vízbontó komplex sérül, a vízmolekulák helyett nagy mennyiségben jelen lévő, alternatív elektrondonorok juttatnak elektronokat a PSII-höz *in vivo* (Tóth és mtsai., 2007a). Ismert az is, hogy *in vitro* körülmények között, izolált tilakoidmembrán-szuszpenzió Tris-mosás után az aszkorbát alternatív elektrondonorként viselkedik (Mano és mtsai., 1997). Annak bizonyítására, hogy az aszkorbát a PSII alternatív elektrondonora *in vivo* körülmények között, vad típusú és aszkorbát-hiányos (*vtc2-1* mutáns; Conklin és mtsai., 2000; Giacomelli és mtsai., 2006; Dowdle és mtsai., 2007; Laing és mtsai., 2007; Linster és Clarke, 2008) *A. thaliana* növényeket hasonlítottunk össze. A nedves tömegre vonatkoztatott aszkorbát tartalom a nevelési körülmények mellett a vad típusúban és a *vtc2-1* mutánsban körülbelül 3,4 és 0,5  $\mu\text{mol g}^{-1}$  volt (az 4.2.2.2. részben leírtak alapján meghatározva), tehát a *vtc2-1* mutánsban a teljes aszkorbát tartalom 15%-a volt csak jelen van a vad típushoz képest. Mivel az aszkorbát sokrétű szerepet tölt be a sejtekben, teljes hiánya letális fenotípust eredményezne. A *vtc2-1* mutáns növények kb. 30%-kal kisebb méretűek a vad típushoz képest (Müller-Moulé és mtsai., 2004). Megfigyelték azt is, hogy a mutánsban alacsonyabb a nem-fotokémiai kioltás, de az elektrontranszport aktivitása és az oxigénfejlesztő képessége megegyezik a vad típusával (Müller-Moulé és mtsai., 2002, 2004). Ezt az általunk végzett gyors klorofill-a fluoreszcencia indukciós mérések (OJIP kinetika) is alátámasztják (9. ábra).

A fluoreszcencia indukciós görbe (OJIP) mérése sokrétű információt szolgáltat a lineáris elektrontranszport különböző folyamatairól (Govindjee, 2004; Lazár, 2006; Schansker és mtsai., 2014). Sötétadaptálást követően az OJIP kinetika O (vagy  $F_o$ , összes  $Q_A$  oxidált állapotban van) szintről indul és kb. 300 ms alatt éri el a maximális intenzitását (P, az összes  $Q_A$  redukált) a J (~2 ms) és az I (~30 ms) lépéseken keresztül. A kezdeti O-J szakasz (0-3 ms) a PSII elsődleges fotokémiai reakcióiról ad információt, ez a szakasz erőteljesen függ a fényintenzitástól (Neubauer és Schreiber, 1987; Strasser és mtsai., 1995). A középső J-I szakasz (3-20 ms) a PQ-pool redukáltságát mutatja (Schreiber és mtsai., 1989; Tóth és mtsai., 2007b). Az utolsó I-P szakasz (30-300 ms) a PSI-től függő elektrontranszportot tükrözi (Schansker és mtsai., 2005, 2006). Telítési fény esetén P értéke eléri a maximális  $F_m$  értékét. Az  $F_o$  és  $F_m$  értékek különbsége adja a variábilis fluoreszcenciát ( $F_v$ ). Az  $F_m$ -re normalizált  $F_v$

( $F_v/F_m$ ) a PSII fotokémiai hatékonyságáról szolgáltat információt (Kitajima és Butler, 1975; Demming és Björkman, 1987; Krause, 1991; Schansker és mtsai., 2014).

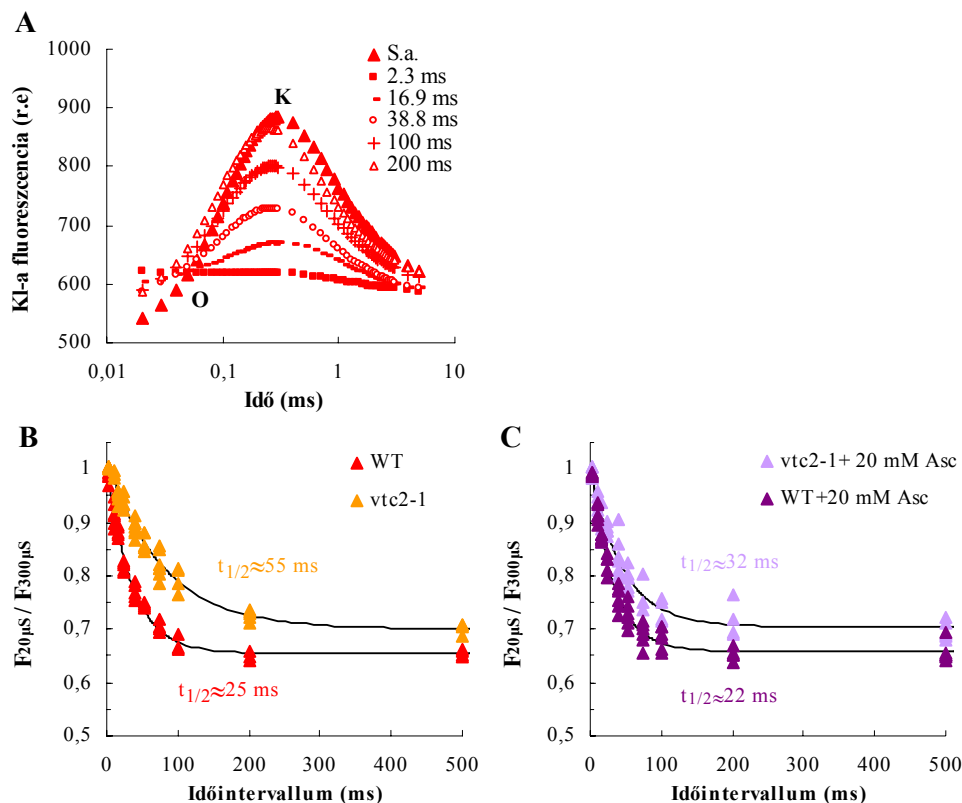


**9. ábra.** Gyors klorofill-a fluoreszcencia (OJIP) tranziensek hőkezelt (49°C, 40s) és kezeletlen vad típusú (WT) és aszkorbát-hiányos (*vtc2-1*) *A. thaliana* leveleken. A minta gerjesztése vörös (650 nm hullámhosszúságú) fényel történt, 3500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűséggel. Minden egyes görbe nyolctíz független mérés átlagából készült.

A kezeletlen vad típusú és *vtc2-1* levelek OJIP kinetikája (9. ábra) és  $F_v/F_m$  értéke lényegében megegyezik (kb. 0,82). Ha hőkezeléssel (49 °C, 40 s vízfürdőben) teljesen inaktiváljuk az OEC-t, az OJIP görbe kinetikája teljesen megváltozik. A J-I szakasz eltűnik és megjelenik a K lépés (Srivastava és mtsai., 1997), amelynek maximuma 300 és 400  $\mu\text{s}$  között található (Srivastava és mtsai., 1997; Tóth és mtsai., 2007a). A K lépés egyetlen töltésszeparációt jelez, amiben a TyrZ az elektrondonor. Ezt követően a fluoreszcencia intenzitása a  $Q_A^-$  re-oxidációja következtében néhány ms alatt lecsökken az  $F_0$  szintre, mivel a  $Q_A^-$  reoxidálódik a  $Q_B$  által. Azonban 0,2-2 másodperc körül jelentős fluoreszcencia emelkedés figyelhető meg (9. ábra), amely azzal magyarázható, hogy alternatív donorok elektronokat juttatnak a PSII-höz, és ez teszi lehetővé a  $Q_A$  újbóli redukcióját (Tóth és mtsai., 2007a). Hőkezelt (49 °C, 40 s vízfürdőben) *vtc2-1* levelekben ez a második csúcs sokkal kisebb és késleltetett a vad típushoz képest. Ebből arra következtethetünk, hogy az alternatív donorokból származó elektronok mennyisége alacsonyabb, mint a vad típusban.

A fluoreszcencia indukció kezdeti szakaszát felhasználva, dupla fényimpulzusokkal meghatározható az elektronátadás félideje ( $t_{1/2}$ ) az alternatív donor és a TyrZ között, inaktív OEC mellett (Tóth és mtsai., 2007a). Az első 5 ms-os fényimpulzus alatt bekövetkezik egy töltésszeparáció, majd a  $Q_A^-$  re-oxidálódik; az OEC aktivitás hiányában TyrZ is oxidált állapotban van. A  $Q_A$  újabb redukciója akkor lehetséges, ha valamilyen donor által a TyrZ<sup>+</sup>

ismét redukálódik. Ez a re-redukció egy második 5 ms-os fényimpulzus alkalmazásával nyomon követhető, ha meghatározzuk a K lépés amplitudóját a két fényimpulzus közötti sötétperiódus időtartamának függvényében. A 10A ábra mutatja, hogy 2,3 ms sötétperiódus után még nincs variábilis fluoreszcencia, ami azt jelenti, hogy az OEC teljesen inaktív, mivel aktív OEC esetében az elektronátadás félideje  $t_{1/2}$  0,1-1 ms között van (Babcock és mtsai., 1976). A két fényimpulzus közötti sötétperiódus hosszának növelésével (16,9-200 ms) a K lépés amplitudója fokozatosan helyreáll a sötétben mért szintre, tehát a  $\text{TyrZ}^+$  alternatív



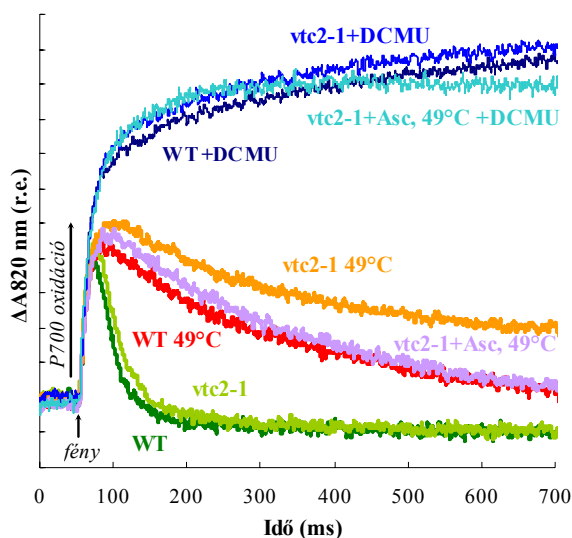
**10. ábra.** Az aszkorbáttól a PSII-höz történő elektronátadás félideje hőkezelt (49°C, 40s) vadtypusú (WT) és aszkorbát-hiányos (*vtc2-1*) *A. thaliana* levelekben. A K lépés amplitudójának regenerációja (A) két 5 ms-os ( $3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűség) fényimpulzus közötti sötétperiódus időtartamának növelésével (2,3 ms-től 200 ms-ig; S.a. - sötétadaptált minta) követhető. A K lépés regenerációja - amelyet a  $F_{20\mu\text{s}}/F_{300\mu\text{s}}$  értékek alapján számoltunk - exponenciális függvény szerint alakul, hőkezelt levelekben külsőleg hozzáadott aszkorbáttal (20 mM; C) és anélkül (B).

elektron donorok által redukálódik. A K lépés ( $F_{20\mu\text{s}}/F_{300\mu\text{s}}$ ) regenerációja exponenciális függvény szerint alakul, amelynek félideje ( $t_{1/2}$ ) jellemzi a PSII-höz érkező elektronátadás sebességét. Az OEC hővel való inaktivációját követően vadtypusú *A. thaliana* növényekben ez az érték 25 ms, míg a *vtc2-1* mutánsban 55 ms (10B ábra). Hőkezelés után, ha a *vtc2-1* mutáns leveleket aszkorbát-oldatban inkubáljuk akkor a  $t_{1/2}$  lecsökken 55 ms-ról 32 ms-ra (10C ábra), míg vadtypus esetében sokkal kisebb ez a csökkenés (25 ms-ról 22 ms-ra). Ez arra utal, hogy

az elektronátadás sebessége ill. félideje ( $t_{1/2}$ ) függ a levelek aszkorbáttartalmától. Ezen adatok arra utalnak, hogy az aszkorbát juttatja el az elektronokat a PSII-höz *in vivo* körülmények között.

Ezen eredményeket 820 nm-es abszorbanciamérések (lásd 4.2.2.7. fejezet) is alátámasztják (11. ábra), amelyek a PSI-n belüli elektrontranszportról szolgáltatnak információt. Sötétadaptált, kezeletlen levelekben a  $P_{700}$  és PC kezdeti gyors oxidációját (20 ms) egy gyors re-redukció követi (200 ms). A 11. ábrán látható, hogy nincs különbség a kezeletlen vad típusú és *vtc2-1* levelek között, ami azt mutatja, hogy aktív OEC mellett az aszkorbát nem járul hozzá a  $P_{700}$  redukciójához.

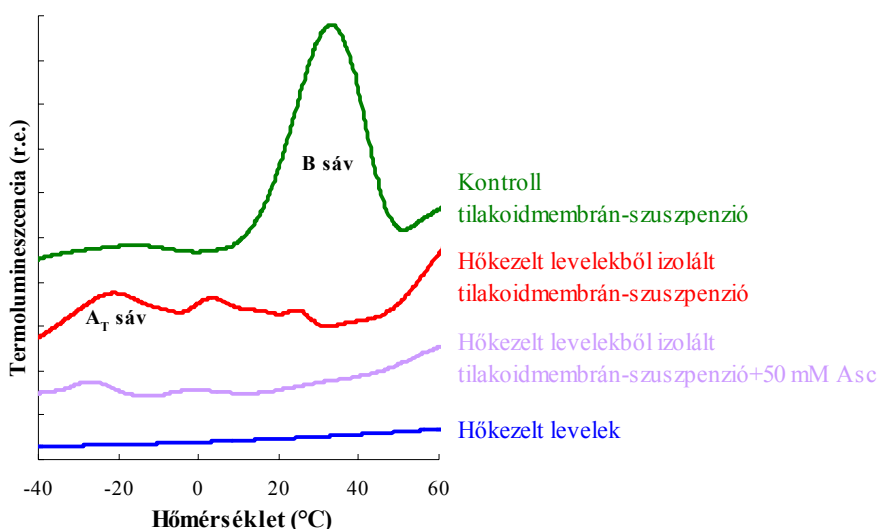
Hővel teljesen inaktivált vízbontó komplexszel rendelkező mintákban is megfigyelhető a  $P_{700}$  kezdeti oxidációja; ezt egy viszonylag lassú re-redukció követi, amely sokkal lassabb a *vtc2-1* levelekben, mint a vad típusban (11. ábra). Azonban, ha a *vtc2-1* leveket hőkezelés előtt 20 mM-os aszkorbát-oldatban inkubáljuk, a  $P_{700}^+$  re-redukció felgyorsul (11. ábra), és a hőkezelt vad típusúhoz lesz hasonló. Kezeletlen és hőkezelt levelek esetében is a  $P_{700}^+$  re-redukciója DCMU-val gátolható. Jelenlétében a  $P_{700}$  teljesen oxidálódik, mivel nem érkeznek elektronok a PSII felől (11. ábra). Ezen eredmények és a fluoreszcencia-mérések bizonyítják (9. és 10. ábra), hogy ha a vízbontó komplex inaktív, akkor az aszkorbát a PSII elektrondonoraként viselkedik *in vivo* körülmények között.



**11. ábra.** A fényindukált 820 nm-es abszorpciós változások vad típusú (WT) és aszkorbát-hiányos (*vtc2-1*) *A. thaliana* leveleken - amely a PSI-en belüli elektrontranszportról ad információt. A mérések kezeletlen és hőkezelt (49 °C, 40 s) leveleken történtek kúlsőleg hozzáadott aszkorbát (20 mM) és/vagy DCMU (200 μM) jelenlétében. Minden görbe négy-hat független mérés átlagából készült.

### 5.1.2. Az elektronátadás útvonala az aszkorbát és a PSII között

Az aszkorbáttól a PSII felé történő elektronátadást termolumineszcencia mérésekkel (lásd 4.2.2.8. fejezet) tanulmányoztuk. Ez a technika a PSII-n belüli töltés-stabilizálódási és rekombinációs folyamatokról ad információt. Az inaktivált OEC-vel rendelkező tilakoidmembrán-szuszpenzió termolumineszcencia görbéjén a B sáv – ami a vízbontó komplex pozitívan töltött,  $S_2$  és  $S_3$  állapotának és a  $Q_B^-$  rekombinációs reakció eredménye (Vass, 2003) – eltűnik és megjelenik  $-20\text{ °C}$  körül az  $A_T$  sáv (12. ábra), amely a  $Tyr_Z^+$  és a  $Q_A^-$  rekombinációjából ered (Ducruet és Vass, 2009).

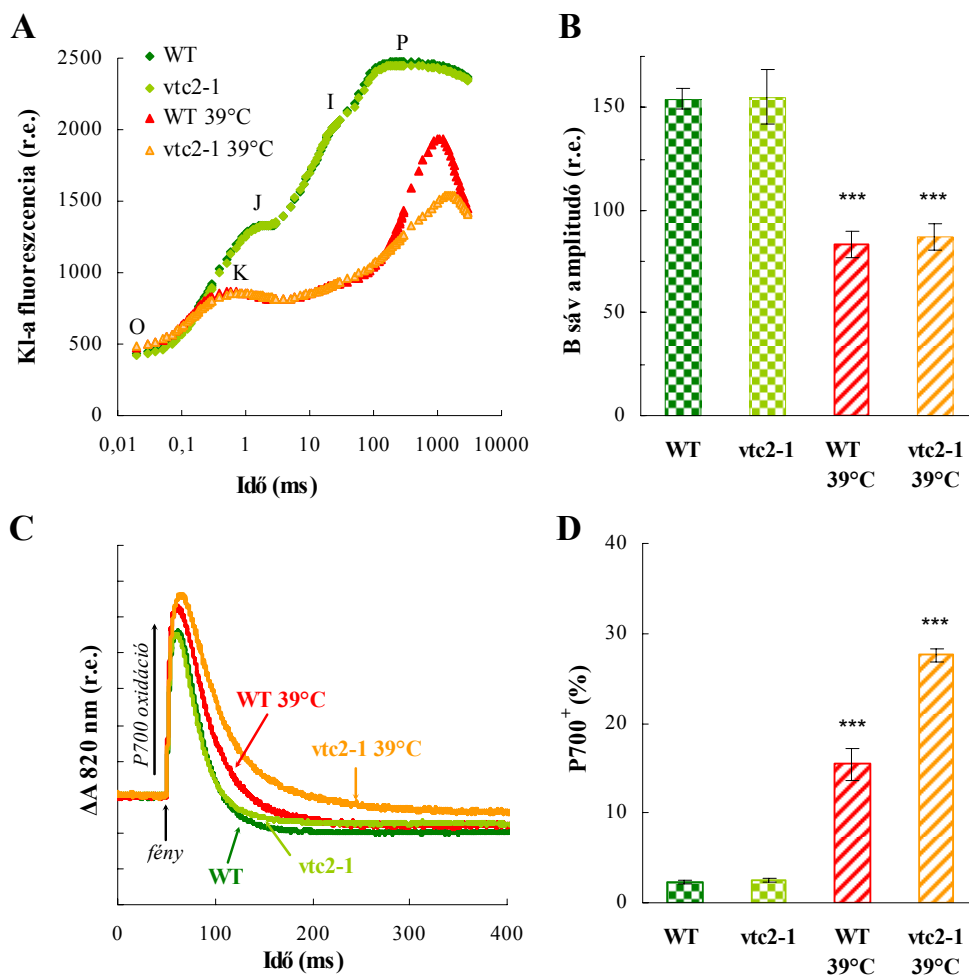


**12. ábra.** Termolumineszcencia mérések – amely a PSII töltés-stabilizálódási és rekombinációs reakcióiról szolgáltatnak információt – hőkezelt ( $48\text{ °C}$ , 40 s) borsó leveleken, illetve hőkezelt és kezeletlen levelekből izolált tilakoidmembrán-szuszenzió külsőleg adott aszkorbát (50 mM Asc) jelenlétében. Minden görbe három független mérés átlagából készült.

Megfigyeltük, hogy ha hővel inaktivált OEC-vel rendelkező tilakoidmembránhoz aszkorbát oldatot adunk, az  $A_T$  sáv nagy mértékben lecsökken, ami azt mutatja, hogy az aszkorbát redukálja a  $Tyr_Z^+$ -t (12. ábra). Az ábrán jól látható, hogy a hőkezelt levelek TL görbéje nem mutat  $A_T$  sávot, mivel a levelek természetüktől fogva tartalmaznak aszkorbátot. Ezen adatok alapján arra következtetünk, hogy az aszkorbáttól az elektronok a PSII-höz a  $Tyr_Z^+$  közvetítésével jutnak el. Korábban Yerkes és Babcock (1980) *in vitro* elektronspin rezonancia spektroszkópiás (ESR) mérései is arra engedtek következtetni, hogy a  $Tyr_Z$  részt vesz az aszkorbát és a PSII közötti elektrontranszportban.

### 5.1.3. Az aszkorbát-függő alternatív elektrontranszport aktivitása élettanilag releváns hőkezelés esetén

Az előzőekben leírt vizsgálatok során az oxigénfejlődést általában rövid ideig tartó hőkezeléssel (48-50 °C, 40 s, 9. ábra) teljesen inaktívtuk, de az élettanilag releváns, enyhébb hőkezelés (39 °C, 15 perc, 13. ábra) alkalmazásával is sikerült az aszkorbát-függő alternatív elektrontranszportot detektálni. Ez a hőkezelés a vízbontó komplex aktivitását kb. a felére



**13. ábra.** Az enyhébb hőkezelés (39 °C, 15 min) hatása az elektrontranszportra vad típusú (WT) és aszkorbát-hiányos (*vtc2-1*) *A. thaliana* levelekben. (A) Gyors klorofill-a fluoreszcencia tranziensek (OJIP), kezeletlen és hőkezelt levelekben, ahol a gerjesztés  $3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűségű vörös fénnel történt. Minden görbe nyolc-tíz független mérés átlagából készült. (B) A termolumineszcenciával detektált B sáv amplitudójának változása kezeletlen és hőkezelt levelekben. Az ábrán szereplő adatok tíz-tizenkettő független mérés átlagát mutatják, szórásként az SE van feltüntetve. (C) A fényindukált 820 nm-es abszorpciós tranziensek kezeletlen és hőkezelt levelekben, amelyeket  $1950 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűségű vörös fénnel mértünk, 1 s-ig. A görbék hat-hét független mérés átlagából készültek. (D) A  $95 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűségű vörös fénnel kioxidálható P<sub>700</sub> mennyiségének százalékos kifejezése hőkezelt és kezeletlen levelekben, a telítési fényimpulzussal ( $10\,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűség) maximálisan kioxidálható P<sub>700</sub> mennyiségéhez viszonyítva. Az ábrán szereplő adatok hét-nyolc független mérés átlagát mutatják, szórásként az SE van feltüntetve. A hőkezelt levelek esetében mért paraméterek piros színnel, míg a kezeletlen levelekben mért paraméterek zöld színnel vannak ábrázolva. A \*\*\* jelölt hőkezelt minták szignifikáns eltérést mutatnak a kezeletlen párjuktól  $p < 0,001$  értékek mellett.

csökkenti mindkét genotípusban, amint azt a TL mérések jelzik: a 13B ábrán látható, hogy a hőkezelt levelekben a B sáv amplitudója felére csökkent a kontrollhoz képest. Megfigyelhető (13A ábra), hogy a hőkezelt minták OJIP kinetikája kb. 100 ms-ig azonos, majd 1 s körül a fluoreszcencia intenzitása kisebb a *vtc2-1*-ben, ami arra utal, hogy a  $Q_A$  redukciója lassabb a vadtypushoz képest. A 820 nm-es abszorpciótranzien্স mérések esetében ismét nincs különbség a kezeletlen genotípusok között, viszont hőkezelés hatására jelentős különbség figyelhető meg a lineáris elektrontranszportban. A  $P_{700}^{+}$  redukciója (13C ábra) sokkal lassabb a *vtc2-1* levelekben, mint a vadtypusban. Telítési fényimpulzussal ( $10\,000\,\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűség) meghatározható a maximálisan kioxidálható  $P_{700}$  mennyisége (Schreiber és Klughammer, 2008). A kezeletlen levelekben  $95\,\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűségű folyamatos aktinikus vörös fénnel történő megvilágítás hatására a maximálisan kioxidálható  $P_{700}$  mennyiségének kb. a 3%-a, míg hőkezelt vadtypusnál kb. 15%-a, *vtc2-1* esetében 30%-a oxidálódik ki (13D ábra). Ez azt mutatja, hogy enyhe hőkezelés esetén is az aszkorbát a PSII alternatív elektrondonora.

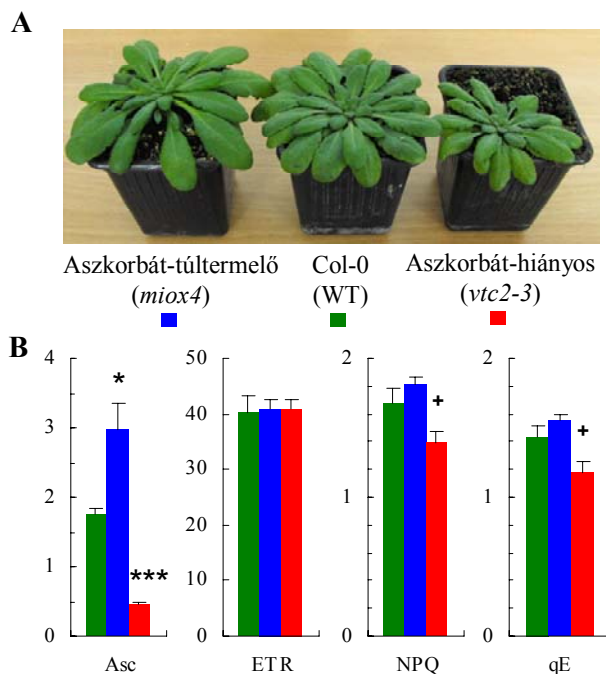
## 5.2. Az aszkorbát a PSII alternatív elektrondonoraként betöltött élettani szerepe

### 5.2.1. Aszkorbát-hiányos és túltermelő *Arabidopsis thaliana* mutánsok fotoszintetikus jellemzői

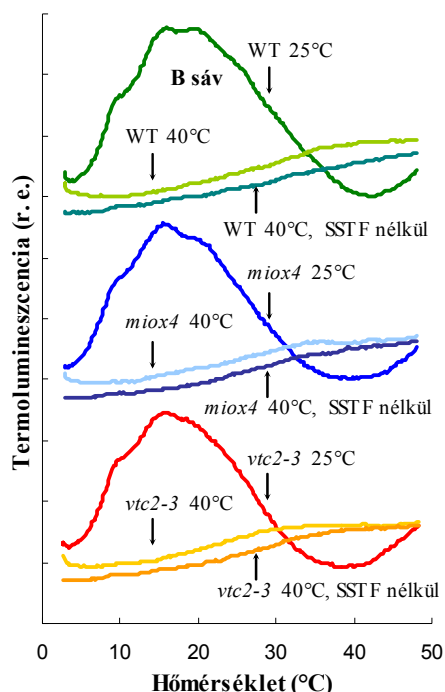
Az aszkorbát PSII alternatív elektrondonoraként betöltött élettani szerepét vadtypusú, *vtc2-3* mutáns (Conklin és mtsai., 2000) és *miox4* transzgénikus (Lorence és mtsai., 2004) *A. thaliana* növényeken tanulmányoztuk. A három genotípusú növény méretbeli különbsége a 14A ábrán jól látható: az aszkorbát-túltermelő kissé nagyobb, míg az aszkorbát-hiányos mutáns kb. 30%-al kisebb a vadtypusú növényhez képest (Müller-Moulé és mtsai., 2004). A növények aszkorbát-tartalmát  $1\,\mu\text{g}$  klorofillra vonatkoztatva adtuk meg (a friss súlyra számított klorofilltartalomban elhanyagolható különbség volt). A *vtc2-3* mutánsban 75%-kal kevesebb, míg a *miox4* esetében kb. 60%-kal magasabb az aszkorbát-tartalom a vadtypushoz képest (14B ábra). Összehasonlítottuk a három genotípust az elektrontranszport sebesség (ETR), a nem fotokémiai kioltás (NPQ), valamint a membrán energizált állapotából származó kioltás (qE,  $\Delta\text{pH}$ ) szempontjából is (14B ábra; lásd 4.2.2.6. fejezet). Az NPQ és a qE kisebb az aszkorbát-hiányos mutánsban és nem figyelhető meg szignifikáns eltérés a *miox4* esetében a vadtypushoz képest. Az ETR esetében nem látható jelentős különbség a három genotípus között. Müller-Moulé és mtsai. (2002, 2003) leírták, hogy az alacsonyabb NPQ érték az alacsony violaxantin-deepoxidáz aktivitás miatt van, amit a lumenben lévő alacsony aszkorbát-tartalom okoz. A vadtypushoz képest magasabb NPQ és qE értéket a *miox4*



transzgenikus növényben valószínűleg a lumenben lévő magasabb aszkorbáttartalom okozza. A lumenben lévő aszkorbáttartalom meghatározása nem lehetséges, ugyanis a kloroplasztisz izolálása során a lumen aszkorbáttartalma legtöbb esetben szinte teljesen eltűnik (Ivanov és Edwards, 2000).



**14. ábra.** Vad típusú (WT), aszkorbát-hiányos (*vtc2-3*) és aszkorbát-túlermelő (*miox4*) *A. thaliana* növények fotoszintetikus paramétereinek összehasonlítása. (A) A nyolc-tíz hetes növényeket növénynevelő kamrában 8/16 óra fény/sötét periódus alatt, 24/18 °C hőmérsékleten, 150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fotonáram-sűrűségeen neveltük. (B) A kezeltetlen növények aszkorbáttartalma (Asc; nmol/μg klorofill), ETR (r.e.), NPQ és qE paramétere. A \*, \*\*, \*\*\* jelölt minták szignifikáns eltérést mutatnak a WT-től p<0,1, p<0,05 és p<0,001 értékek mellett.



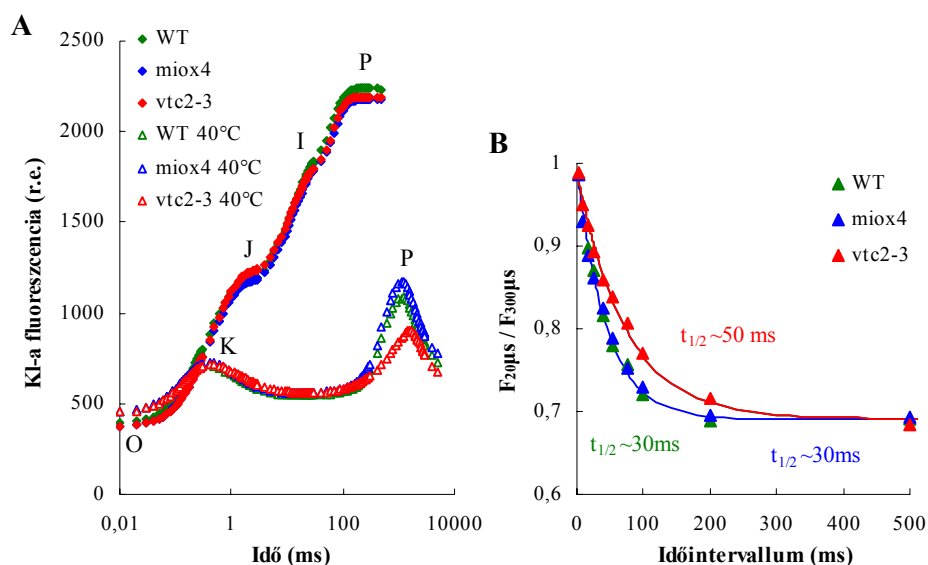
**15. ábra.** Egy SSTF-el gerjesztett és gerjesztés nélkül mért termolumineszcencia görbék kezeltetlen (25 °C) és hőkezelt (40 °C, 15 min) vad típusú, aszkorbát-hiányos (*vtc2-3*) és aszkorbát-túlermelő (*miox4*) *A. thaliana* növényekben. Minden görbe három független mérés átlagából készült.

Az aszkorbát élettani szerepének vizsgálatakor a hőkezelés 40 °C-on 15 percig, sötétben, vízfürdőben történt. Ezen hőstressz esetén is teljesen megszűnt az oxigénfejlődés mindhárom genotípusban, amit a TL görbe B sávjának eltűnése jól mutat (15. ábra). A 40 °C-os hőkezelés élettanilag elfogadható, ugyanis a leveleket a természetben is érheti ilyen hőhatás, különösen szárazságstressz alatt (Burghardt és mtsai., 2008; Shahenshah és Isoda, 2010). A hőkezelés hatására a tilakoidmembrán permeabilitása nem változott meg drasztikusan (1. táblázat; szemben egy 50 °C-os hőkezeléssel, amikor a membrán két oldala közötti elektromos tér néhány ms alatt megszűnik; Tóth és mtsai., 2005).

**1. táblázat.** Fényindukált 515 nm-en mért elektrokróm eltolódás lecsengésének félideje ( $t_{1/2}$ ) hőkezelt (40 °C, 15 perc) és kezeletlen vad típusú (WT), aszkorbát-hiányos (*vtc2-3*) és aszkorbát-túltermelő (*miox4*) *A. thaliana* leveleken (A).

	WT	<i>vtc2-3</i>	<i>miox4</i>
Kezeletlen	55,63 ms	68,99 ms	53,28 ms
40 °C, 15 min	34,15 ms	31,36 ms	44,03 ms

A kezeletlen vad típusú, aszkorbát-hiányos és -túltermelő *A. thaliana* levelek  $F_v/F_m$  értéke és OJIP kinetikája azonos, szemben a hőkezelt (40 °C, 15 min) levelek OJIP görbéjével, ahol az 1 s környékén lévő csúcsnál látunk különbséget. A 49 °C-os, 40 s-os hőkezeléssel megegyezően (9. ábra) ez a csúcs a *vtc2-3* esetében szignifikánsan kisebb



**16. ábra.** OJIP tranziensek hőkezelt (40 °C, 15 perc) és kezeletlen vad típusú (WT), aszkorbát-hiányos (*vtc2-3*) és aszkorbát-túltermelő (*miox4*) *A. thaliana* leveleken (A). A gerjesztés 3500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűségű vörös fényvel történt. A K lépés regenerációja exponenciális függvény szerint alakul és az elektronátadás félidejét ( $t_{1/2}$ ) mutatja (B). Minden görbe hat független mérés átlagából készült.

( $p < 0,001$ ), míg *miox4* esetében nem mutatható ki szignifikáns különbség a vadtypushoz képest (16A. ábra). Ezen eredmény alátámasztja az 5.1. fejezetben leírtakat, miszerint a K lépés intenzitása függ a levelek aszkorbáttartalmától (Tóth és mtsai., 2009).

Mind a három genotípus esetében 40 °C-os, 15 percig tartó hőkezelés esetén is meghatároztuk a  $t_{1/2}$  értéket (a K lépés regenerációjából; 16B ábra). A vadtypusú és a *miox4* levelekben a  $t_{1/2}$  kb. 30 ms, míg *vtc2-3* levelekben az elektronátadás sokkal lassabb volt kb. 50 ms (2. táblázat). Ezen adatok megegyeznek a korábban mért adatokkal (lásd 5.1.1. fejezet), ahol sokkal drasztikusabb (49 °C, 40 s) hőkezelést alkalmaztunk (Tóth és mtsai., 2009).

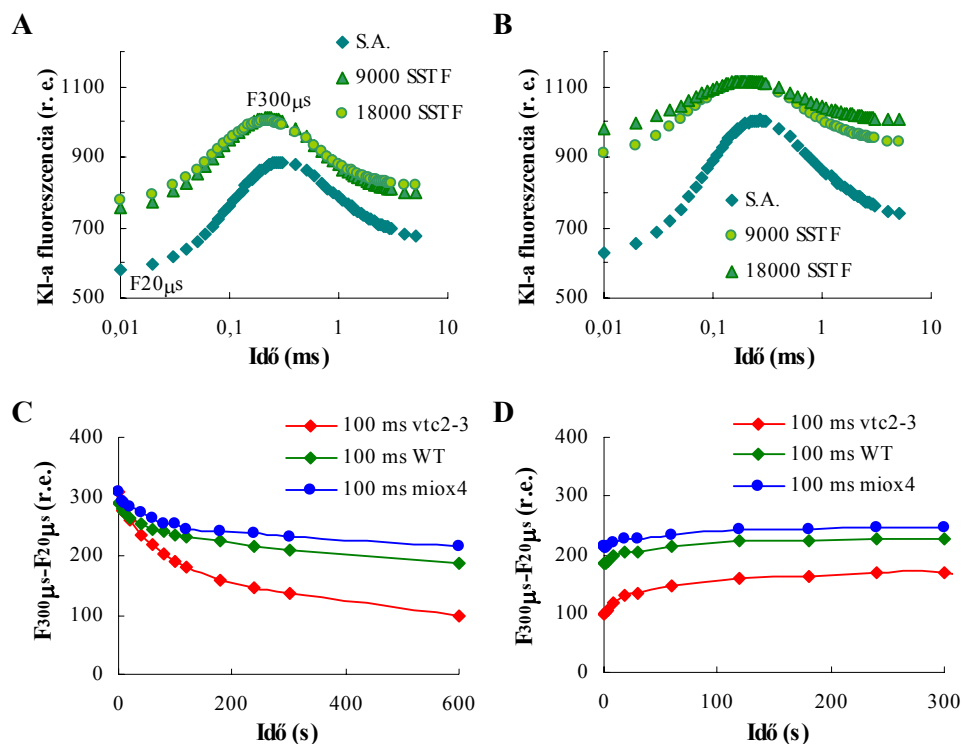
### 5.2.2. Az aszkorbát alternatív elektrondonorként véd a fotoinhibícióval szemben

Ismert, hogy a vízbontó komplex inaktivációja esetén a PSII reakciócentrumok gyorsan inaktiválódnak kis intenzitású megvilágítás hatására: ezt nevezik donor oldal által indukált fotoinhibíciónak. Feltételezéseink szerint az alternatív elektrondonorok jelentős élettani szerepet játszhatnak egyes stresszhatások kivédésében. Donor oldali fotoinhibíció esetén védhetik a PSII reakciócentrumot azáltal, hogy megakadályozzák a  $P680^+$  túlzott mértékű akkumulációját, amely oxidatív stresszhez, és végső soron a reakciócentrumok inaktivációjához vezet.

Hipotézisünk bizonyításához vadtypusú (WT), aszkorbát-hiányos (*vtc2-3*) és aszkorbát-tútermelő (*miox4*) *A. thaliana* növényeket használtunk. A levelek oxigénfejlődésének megszűnését (40 °C, 15 min) követően a növényeket megvilágításnak tettük ki, hogy megvizsgáljuk, hogy a reakciócentrumok inaktivációjának sebessége függ-e a levelek aszkorbáttartalmától.

A hőkezelt levelekben a PSII reakciócentrumok inaktivációjának sebességét először sorozatos SSTF alkalmazásával vizsgáltuk. A vadtypusú levelekben a 200 ms-os időközönként adott 18 000 SSTF után is a K lépés szinte változatlan marad (17A ábra), míg ehhez a *vtc2-3* mutáns levelekben 500 ms-os sötétperiódusra van szükség a két fényimpulzus között. A két fényimpulzus közötti sötétperiódus hosszának elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy az aszkorbát által a  $Tyr_Z^+$  teljesen redukálódni tudjon (a  $t_{1/2}$  vadtypusban kb. 30 és *vtc2-3*-ban kb. 50 ms, ld. 15. ábra). Ha nem elegendő (pl. 100 ms) a sötétperiódus a K lépés teljes regenerációjához, akkor a K lépés amplitúdója jelentősen csökken (17B ábra). Ez a csökkenés a vadtypushoz képest nagyobb volt a *vtc2-3* mutáns levelekben (az amplitúdó 70%-kal csökkent 6000 SSTF adása után) és kisebb a *miox4* esetében (17C ábra). Sötétben a K lépés regenerációja kétfázisú (17D ábra). A gyors regeneráció félideje kb. 4 s, ami valószínűleg a  $Q_B$ -t nem redukáló reakciócentrumok helyreállításából származik (Chylla és mtsai., 1987). A

lassabb szakaszban valószínűleg a sorozatos SSTF hatására károsodott PSII reakciócentrumok részleges helyreállása történik. A gyors klorofill-a fluoreszcencia tranziens mérések alapján megállapítottuk, hogy sorozatos SSTF-ek hatására a reakciócentrumok csak akkor inaktíválódnak, ha a közöttük lévő intervallum nem elegendő a  $\text{Tyr}_Z^+$  aszkorbát általi redukciójához.

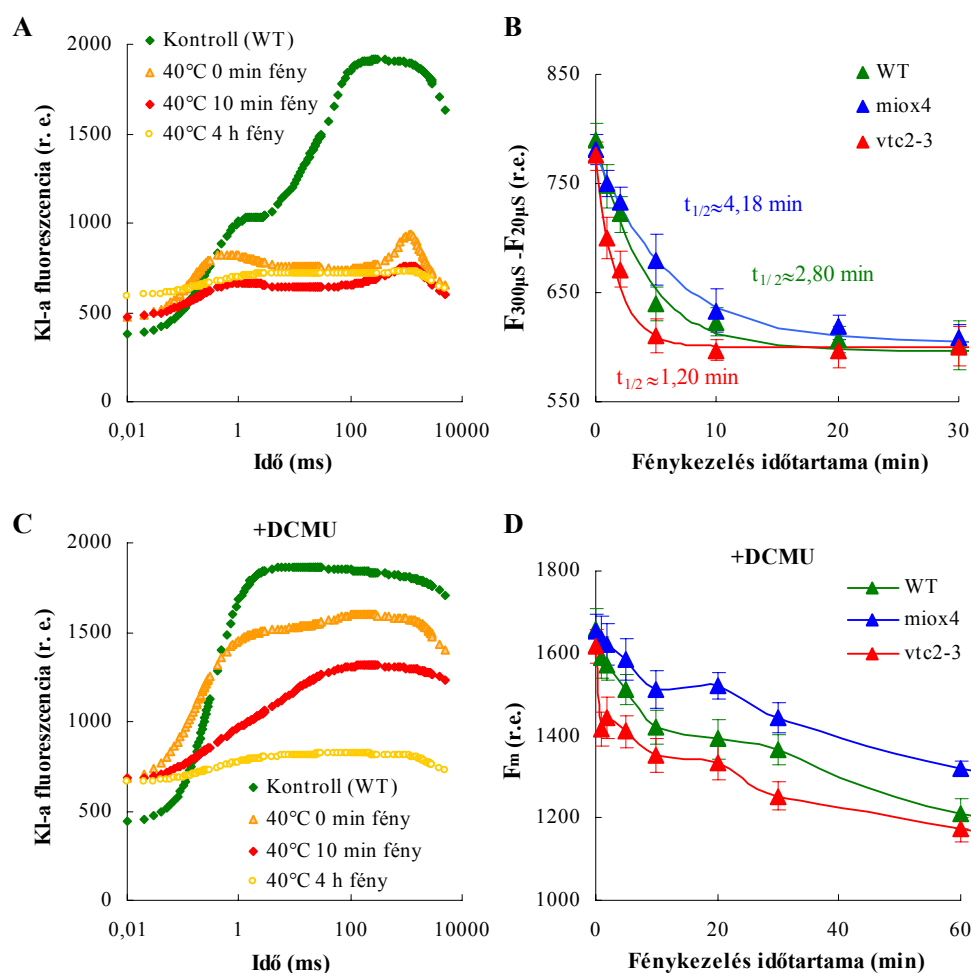


**17. ábra.** Gyors klorofill-a fluoreszcencia tranziensek sötétadaptált hőkezelt vad típusú (WT) *A. thaliana* levelekben (első fényimpulzus) és 18 000 SSTF adása után. Ezen egymást követő fényimpulzusok közötti sötétperiódus hossza 200 ms (A; S.A. - sötétadaptált minta) és 100 ms (B). A K lépés amplitúdójának csökkenése (C) és regenerációja (D) a  $F_{300\mu s} - F_{20\mu s}$  érték alapján került meghatározásra vad típusú (WT), aszkorbát-hiányos (*vtc2-3*) és aszkorbát-túlermelő *A. thaliana* levelekben. A C ábrán az egymást követő SSTF-ek közötti sötétperiódus hossza 100 ms, míg a D ábrán bemutatott K lépés helyreállása sötétben történt. Az ábrán reprezentatív görbék vannak feltüntetve.

Amikor a teljesen inaktív OEC-vel rendelkező leveleket folyamatos, közepes intenzitású (kb.  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűség) fénykezelésnek tesszük ki, akkor fokozatosan és viszonylag gyorsan eltűnik az OJIP görbe K lépése (18A ábra), valamint az 1 s környéken lévő második csúcs is. A K csúcs amplitúdója a fénykezelés idejének függvényében exponenciális kinetika szerint csökken és függ a levelek aszkorbát-tartalmától. Kimutattuk, hogy a K lépés 50%-os csökkenéséhez szükséges megvilágítási idő ( $t_{1/2}$ ) vad típusú levelekben 2,8 min, míg *vtc2-3* ill. *miox4* esetében 1,2 illetve 4,1 min (18B ábra).

A még működőképes PSII reakciócentrumok relatív mennyiségét oly módon határoztuk meg, hogy a hő- és fénykezelés után a leveleket DCMU-kezelésnek tettük ki,

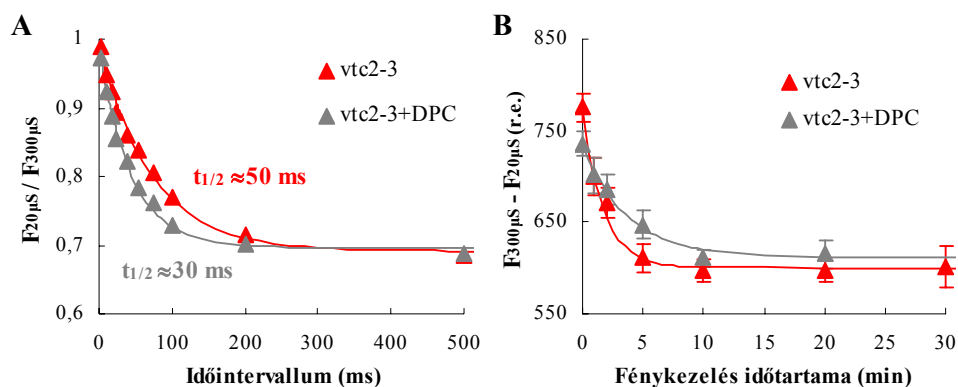
amely által biztosítható a  $Q_A$  teljes redukciója a fluoreszcencia mérés során, inaktív OEC mellett is. Látható (18C ábra), hogy a hőkezelés önmagában mintegy 15%-os  $F_m$  érték csökkenést idézett elő. A fénykezelés hatására a hőstresszelt levelek  $F_m$  értéke tovább csökkent, és 4 óra után már nem volt változó fluoreszcencia megfigyelhető. Az  $F_m$  érték csökkenése (18D ábra) szignifikánsan gyorsabb volt a *vtc2-3* levelekben, mint a vadtypusban ( $t_{1/2}$  10 ill. 23 min), de ez a különbség még kifejezettebb az aszkorbát-túltermelő transzgenikus *A. thaliana* esetében ( $t_{1/2}$  kb. 51 min). Nagyon hasonló félidőket kaptunk a kloroplasztisz fehérjeszintézis-gátló linkomicin jelenlétében is, ami az bizonyítja, hogy 4 óra alatt nem történik jelentős fehérjeszintézis. Érdekes az is, hogy a fénykezelt levelekben DCMU jelenlétében a gyors fluoreszcencia kinetika mérése során az  $F_m$  érték 50%-ának eléréséhez



**18. ábra.** Gyors klorofill-a fluoreszcencia tranziensek (A és C) valamint a K lépés csökkenésének félideje (B) és a DCMU jelenlétében mért  $F_m$  érték csökkenése (D), hőkezelt (40 °C, 15 perc) vadtypusú (WT), aszkorbát-hiányos (*vtc2-3*) és aszkorbát-túltermelő (*miox4*) *A. thaliana* leveleken folyamatos fénykezelést (fehér fény, 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűség) követően. A K lépés amplitudójának csökkenését az a A ábrán lévő  $F_{300\mu s} - F_{20\mu s}$  értékekből számoltuk. A DCMU-kezelés a hőkezelt levelek fénykezelése után történt, sötétben. Minden görbe hat-nyolc független mérés átlagából készült. Az ábra B és D részén a kapott átlag értékekre egykomponensű exponenciális függvényt illesztettünk, szórásként az SE van feltüntetve.

szükséges idő drasztikusan megnőtt, vad típus esetében a  $t_{1/2}$  0,3 ms-ról 2,3 ms-ra emelkedett egy óra alatt, és ez a hatás még kifejezettebb volt a *vtc2-3* mutánsban (a  $t_{1/2}$  0,3 ms-ról 3 ms-ra nőtt).

A K lépés intenzitásának gyors csökkenése és a fluoreszcenciaemelkedés lassulása DCMU jelenlétében arra enged következtetni, hogy a fotoinhibíció első lépéseként lelassul a Tyr<sub>Z</sub>-P680<sup>+</sup> közötti elektrontranszport (Blubaugh és mtsai., 1991), amit a PSII reakciócentrumok teljes inaktivációja követ. Adataink azt is mutatják, hogy a PSII reakciócentrumok inaktivációjának sebessége nagymértékben függ a levelek aszkorbát-tartalmától. Az aszkorbát nem csak a PSII alternatív elektrondonora, hanem szabadgyök-kioltó hatása révén véd a szabadgyökökkel (ROS) szemben is (Asada 1999). Annak bizonyítására, hogy az aszkorbát védő szerepe nem csak a szabadgyök-kioltó tulajdonságának köszönhető, hanem alternatív donorként is védi a reakciócentrumokat, DPC-kezelést végeztünk. Kimutattuk, hogy a 2 mM-os DPC oldattal kezelt *vtc2-3* levelek reakciócentrumába ugyanolyan sebességgel érkezzenek az elektronok, mint a vad típusban (19. ábra, 2. táblázat), sőt a fluoreszcencia intenzitása 1 s körül meg is emelkedik. Fénystressz hatására azt tapasztaltuk, hogy a DPC oldatban inkubált *vtc2-3* levelekben a K lépés amplitúdója hasonló sebességgel csökkent ( $t_{1/2}$  2,5 min), mint a vad típusban ( $t_{1/2}$  2,8 min). Ez azt bizonyítja, hogy az aszkorbát nem csak szabadgyök-kioltóként, hanem PSII donorként is véd a fotoinhibícióval szemben, illetve lassítja a PSII inaktivációját.

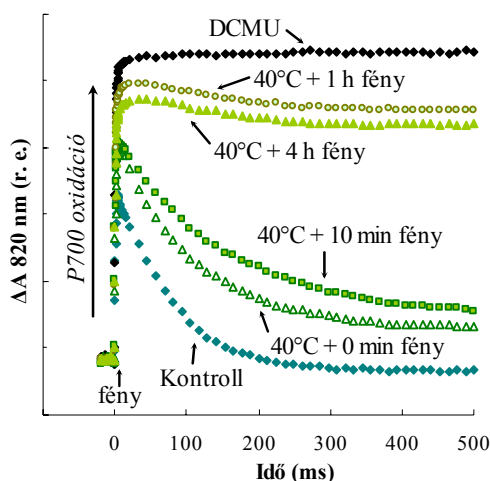


**19. ábra.** Dupla fényimpulzusokkal meghatározott elektronátadás félideje ( $t_{1/2}$ ; A) és a fénykezelés hatására bekövetkezett K lépés csökkenésének félideje (B) hőkezelt aszkorbát-hiányos (*vtc2-3*) *A. thaliana* levelekben DPC oldatban (2 mM) való inkubálás után és anélkül. A  $t_{1/2}$  meghatározásához az OJIP görbe  $F_{20\mu s}$  és  $F_{300\mu s}$ -nál mért értékét használtuk (A:  $F_{20\mu s} / F_{300\mu s}$ ; B:  $F_{300\mu s} - F_{20\mu s}$ ). Minden érték hat független mérés átlaga és az így kapott értéke egykomponensű exponenciális függvényt illesztettünk, szórásként az SE van feltüntetve.

**2. táblázat.** Az aszkorbáttól a PSII-höz történő elektronátadás félideje ( $t_{1/2}$ ) a hőkezelt vad típusú (WT) és aszkorbát-hiányos (*vtc2-3*) levelekben illetve hőkezelt *vtc2-3* levelekben DPC oldatban történt inkubálás után (A). A K lépés csökkenésének félideje hő- és fénykezelt WT, *vtc2-3* és DPC-vel kezelt *vtc2-3* *A. thaliana* levelekben (B).

$t_{1/2}$	WT	<i>vtc2-3</i>	<i>vtc2-3</i> +1mM DPC
A) aszkorbáttól a PSII-höz történő elektronátadás félideje	30,5±1,3 ms	49,7±3,6 ms	30,4±2,5 ms
B) K lépés csökkenésének félideje	2,8±0,5 min	1,4±0,1 min	2,5±0,3 min

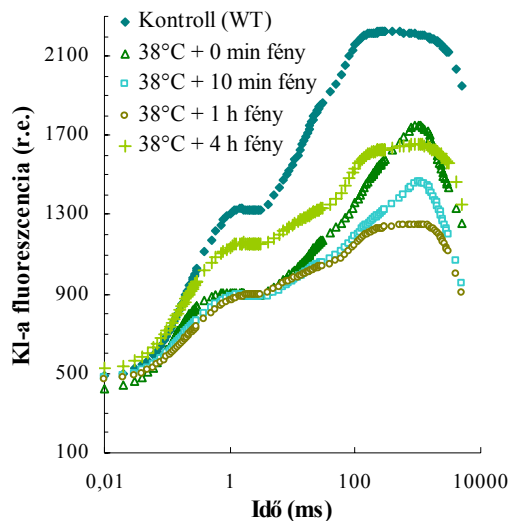
A 20. ábrán azt láthatjuk, hogy a vad típusú levelekben a  $P_{700}$  kezdeti gyors oxidációját egy gyors re-redukció követi, ami kb. 200 ms alatt következik be és ez a PSII felől érkező elektronoknak köszönhető (Tóth és mtsai., 2009; 5.1.1. fejezet). A hőkezelt (40 °C, 15 perc) levelek esetében, ahol az elektrondonor az aszkorbát, ez a re-redukció jóval lassabb, és a fénykezelés hatására tovább lassul a  $P_{700}^+$  re-redukciója: 1 óra fénykezelés hatására már csak nagyon korlátozott re-redukció figyelhető meg (20. ábra). Ezek az adatok azt mutatják, hogy fénykezelés alatt a hőkezelt levelekben a PSII-től a PSI felé történő elektrontranszport sebessége lecsökken, vagy esetenként teljesen megszűnik.



**20. ábra.** Fényindukált 820 nm-es abszorpciós változások kezeltlen és hőkezelt (40 °C, 15 perc) valamint a hőkezeltet követő fénykezelés (300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűség) hatására vad típusú *A. thaliana* levelekben. Ezen tranzienseket DCMU jelenlétében is meghatároztuk. A sötétadaptált minták 5000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűségű vörös fényvel lettek megvilágítva. A görbék négy-öt független mérés átlagából készültek.

A fotoinhibíció hatását megvizsgáltuk enyhébb hőkezelés után is (38 °C, 15 min). A TL mérésekből kiderült (adatok nem kerülnek bemutatásra), hogy e hőkezelés hatására az OEC részben károsodott, a B sáv kb. 40%-kal csökkent. A variábilis fluoreszcencia ez esetben is csökkent, de kisebb mértékben, mint a 40 °C-os hőkezelés után. Az OJIP görbén a fluoreszcencia maximuma 1 s körül található, hasonlóan azokhoz a mintákhoz, ahol az összes OEC inaktív volt, azonban megfigyelhető egy váll is 200 ms-nál, ami viszont a kontroll levelekre jellemző (21. ábra). Megvilágítás (300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűség) hatására a

hőkezelt levelekben tovább csökkent a variábilis fluoreszcencia, mégpedig az 1 s környékén lévő csúcs eltűnése következtében. Tehát az enyhébb hőkezelés esetében is megfigyelhető, hogy a megvilágítás hatására fokozatosan csökken az aktív reakciócentrumok mennyisége, 4 óra megvilágítás után azonban megkezdődött a helyreállítás.

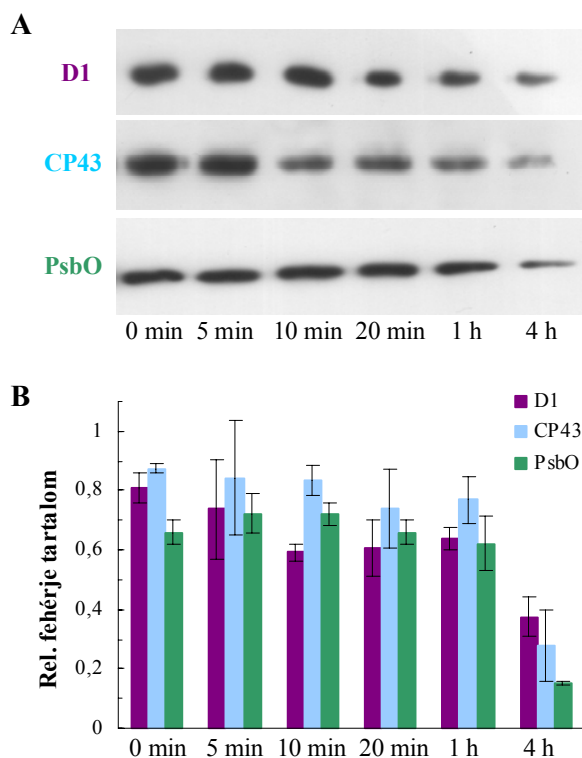


**21. ábra.** Gyors klorofill-a fluoreszcencia tranziensek kezeletlen valamint hőkezelést (38 °C, 15 min) követő fénykezelés ( $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűség) után vad típusú (WT) *A. thaliana* leveleken. A görbék négy-öt független mérés átlagából készültek.

### 5.2.3. A hőkezelt levelek PSII fehérjéinek fényindukált degradációja

Az általunk kapott eredményekből (17. ábra) jól látható, hogy ha a hőkezelt (40 °C, 15 min) leveleket fénystressznek tesszük ki, 4 óra után a PSII reakciócentrumok elveszítik töltésszétválasztó képességüket. A fotoinhibíció során a reakciócentrumok inaktivációját a reakciócentrumok degradációja, különösen a D1 protein mennyiségi változása is jól tükrözi (Schuster és mtsai., 1988; Aro és mtsai., 1993; van Wijk és mtsai., 1994). Western blot analízissel (lásd 4.2.2.12. fejezet) vizsgáltuk a hőkezelt és fotoinhibíciónak kitett levelekben a fehérjék mennyiségének változásait. A 22. ábrán látható, hogy a vad típusú levelekben hőkezelés hatására a D1 fehérje mennyisége kb. 20%-kal csökkent: ez a megállapítás megegyezik a korábban publikált eredményekkel (Yoshioka és mtsai., 2006; Yamashita és mtsai., 2008). A hőkezelést követő fénystressz hatására tovább folytatódott a D1 degradációja: 1 h után kb. 40%-kal, míg 4 h elteltével kb. 65%-kal csökkent a D1 fehérje mennyisége a kezeletlen mintához képest (22. ábra). Emellett a CP43 és a PsbO proteinek degradációját is megfigyeltük: 4 órás fénykezelés után a hőkezelt levelekben a CP43 fehérje 70%-a, míg a PsbO-nak a 80%-a eltűnt. Ezen eredmények mutatják a teljes PSII core komplex fokozatos leépülését fénykezelés alatt a hőkezelt levelekben.

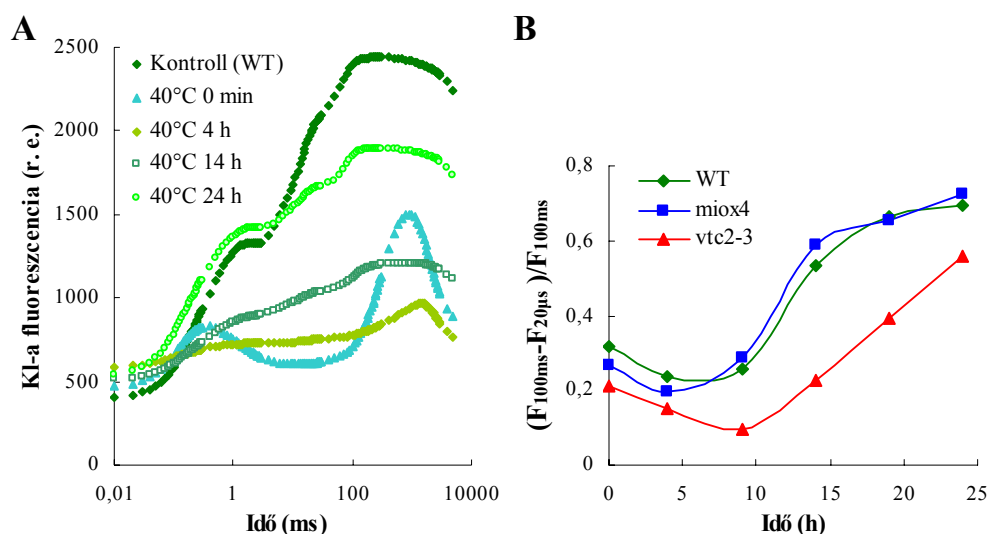




**22. ábra.** A D1, CP43 és PsbO fehérjék mennyiségének változása hőkezelt (40 °C, 15 perc) illetve hő és fénykezelt (300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűség) vad típusú (WT) *A. thaliana* levelekben. A fehérjék mennyiségét western blot technikával határoztuk meg. Az előhívott filmet (A) digitalizáltuk és denzitometráltuk (B). Az A ábrán egy reprezentatív film látható. A B ábrán szereplő adatok négy-öt független mérés átlagát mutatják és szórásként az SE van feltüntetve.

#### 5.2.4. A hőkezelt követő helyreállítás mértéke függ a levelek aszkorbát-tartalmától

Megvizsgáltuk, hogy az aszkorbát milyen hatással van a PSII aktivitásának helyreállítására a hőkezelt követően. A kísérlet során 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűségű megvilágítást használtunk, ami megegyezett a nevelési fény intenzitásával. Sötétben nem figyelhető meg helyreállítás (Tóth és mtsai., 2005), és magasabb fényintenzitáson (300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűség) nagyon lassan, vagy egyáltalán nem történik meg. 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fényintenzitáson az első néhány órában megfigyelhető a K lépés amplitúdójának csökkenés (23. ábra) hasonlóan a magasabb (300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűség) fényintenzitáson tapasztaltakhoz. Azonban 24 óra elteltével bekövetkezik az OJIP görbe jelentős helyreállása (23A ábra). A PSII aktivitás helyreállítását a  $(F_{100\text{ms}} - F_{20\mu\text{s}})/F_{100\text{ms}}$  paraméter (Tóth és mtsai., 2005) segítségével követtük a megszokott  $F_v/F_m$  érték helyett. A formula az  $F_m$  érték (P) helyett a 100 ms-nál mért fluoreszcencia értéket tartalmazza, mivel hőkezelt mintákban a P értéket az aszkorbát-tartalom jelentősen befolyásolja (16. ábra, 5.2.1. fejezet). Ezen paraméter segítségével megállapítottuk, hogy a helyreállítás mértéke és sebessége jóval nagyobb a vad típusú és az aszkorbát-tútermelő növényekben, mint az aszkorbát-hiányosban (23B ábra).



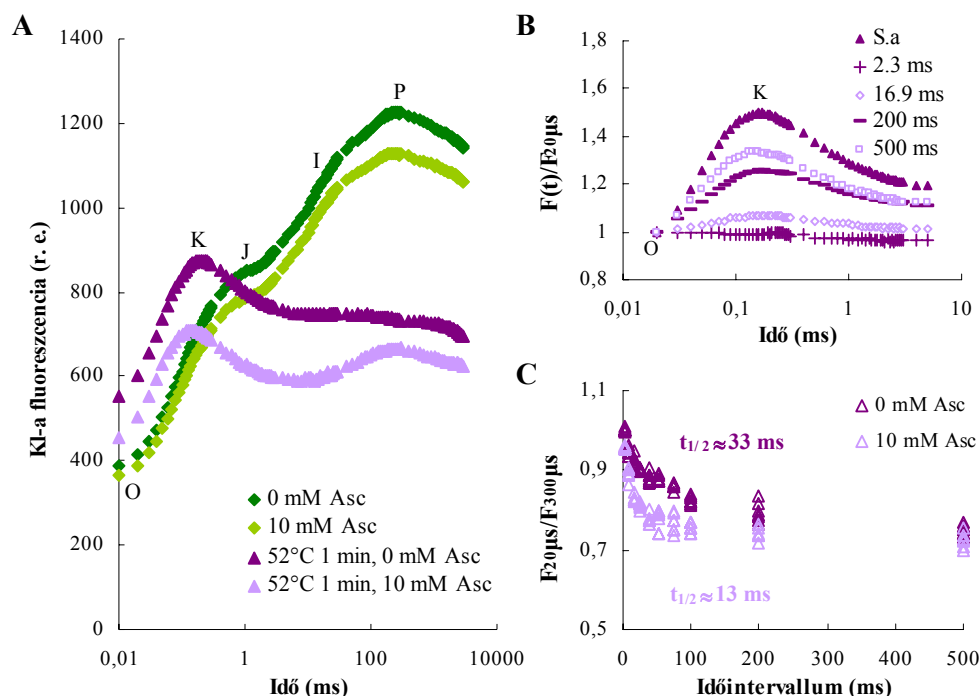
**23. ábra.** A PSII aktivitásának fényben ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűség) történő helyreállása hő- ( $40^\circ\text{C}$ , 15 perc) és fénykezelést ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűség) követően vad típusú (WT) *A. thaliana* levelekben. Az OJIP tranzienseket a hőkezelést követő 0, 4, 14, 24 óra elteltével mértük (A). A fotoszintetikus aktivitás helyreállása a  $(F_{100ms} - F_{20\mu s}) / F_{100ms}$  paraméterekből számolva vad típusú, aszkorbát-hiányos (*vtc2-3*) és aszkorbát-túlermelő (*miox4*) levelekben (B). Az ábra A részén szereplő görbék négy-öt független mérés átlagából készültek, míg a B részen reprezentatív görbék vannak feltüntetve.

### 5.3. Az aszkorbát elektrontranszportra és hidrogéntermelésre gyakorolt hatása *Chlamydomonas reinhardtii* sejtekben

#### 5.3.1. Az aszkorbát a PSII alternatív elektrondonora *Chlamydomonas reinhardtii* sejtekben

Az aszkorbát PSII alternatív elektrondonor szerepét *C. reinhardtii* sejteken is megvizsgáltuk OJIP mérések segítségével (24. ábra), hasonlóképpen, mint *A. thaliana* leveleken (5.1.1. fejezetben). Mivel aszkorbát-hiányos *C. reinhardtii* vonalak nem állnak rendelkezésre, így az aszkorbát hatását a kultúrához külsőleg hozzáadva vizsgáltuk (10 mM aszkorbát, kb. 15 perces sötétben való inkubálással). Az aszkorbát-kezelt kultúra esetében kismértékű különbség figyelhető meg az OJIP görbében a kontrollhoz képest (24A ábra). Amikor hőkezeléssel ( $52^\circ\text{C}$ , 1 min) teljesen inaktívtáztuk az OEC-t, megjelent a K lépés, ami után a fluoreszcencia intenzitása lecsökkent ( $Q_A^-$  re-oxidációja). Azonban külsőleg adott aszkorbát (10 mM) jelenlétében 1 s körül kismértékű fluoreszcencia emelkedést figyelhetünk meg, ami a  $Q_A$  redukciójára utal. A *C. reinhardtii* sejteknél is meghatároztuk az elektronátadás félidejét dupla fényimpulzusokkal (24B ábra), az 5.1.1. fejezetben leírtak alapján. A K lépés regenerációja ( $F_{20\mu s} / F_{300\mu s}$ ) exponenciális függvény szerint alakult; ez a regeneráció megfelel a PSII felé érkező elektronátadásnak. *C. reinhardtii* sejtekben normál körülmények között a  $t_{1/2}$  33 ms volt, ami a külsőleg hozzáadott aszkorbáttal (10 mM) 13 ms-ra csökkent (24C ábra); megjegyzendő azonban, hogy a K-lépés helyreállása nem teljes

mértékű. Hasonló eredményeket kaptunk 5 és 50 mM aszkorbátoldat hozzáadása után is. Ezen eredményeink azt mutatják, hogy *C. reinhardtii* sejtek esetében is az aszkorbát elektronokat képes a PSII számára szolgáltatni, ha az OEC inaktív.

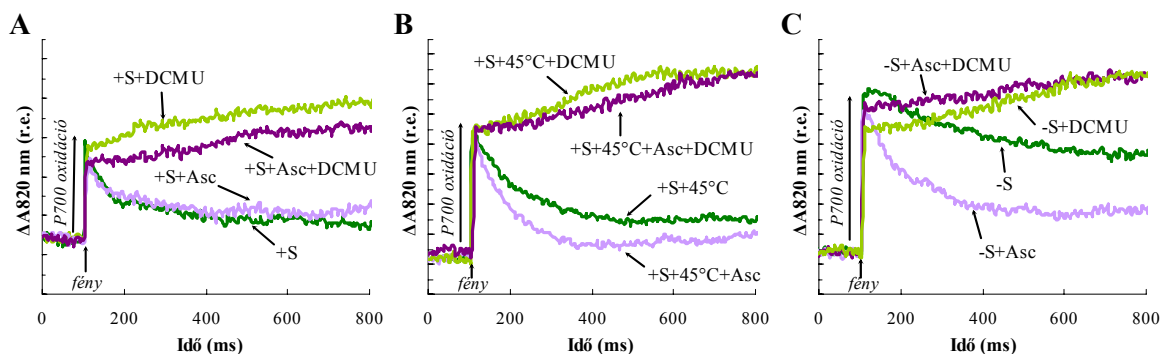


**24. ábra.** Gyors klorofill-a fluoreszcencia (OJIP) tranziensek kontroll (0 mM Asc), aszkorbát kezelt (10 mM Asc), hőkezelt (52 °C, 1 min, 0 mM Asc) valamint hő- és aszkorbát kezelt (52 °C, 1 min, 10 mM Asc) CC-124 *C. reinhardtii* kultúra esetében (A). A gerjesztés 3500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűségű vörös fényvel történt. Dupla, 5 ms-os fényimpulzusokkal meghatározható a K lépés regenerációja (B; S.a. - sötétadaptált), ami exponenciális függvény szerint alakul, az elektronátadás félidejét ( $t_{1/2}$ ) mutatja (C). Az ábra feltüntetett értékek négy-öt független mérés átlagából készültek.

Ezen eredményeinket a 820 nm-es abszorpciótranzien্স-méréseink (lásd 4.2.2.7. fejezet) is alátámasztották: a normál körülmények között nevelt S-01 *C. reinhardtii* törzsnél megfigyeltük, hogy erős, folyamatos fényvel történő megvilágítás hatására a  $P_{700}$  kezdeti gyors oxidációját gyors redukció (kb. 200 ms, 25A ábra) követte, amit a külsőleg hozzáadott aszkorbát (10 mM) nem befolyásolt. Azonban, ha az OEC-t hőkezeléssel (45 °C, 5 min) inaktívtuk, a kezdeti gyors  $P_{700}$  oxidációt egy viszonylag lassú redukció követette (25B ábra). Ezen folyamat külsőleg hozzáadott aszkorbát (10 mM) hatására jelentősen felgyorsult, és DCMU-val gátolható volt. Ezen eredmény bizonyítja, hogy *C. reinhardtii* sejtekben is ugyanúgy, mint növényekben, az aszkorbát a PSII elektrondonoraként funkcionálva fenntartja a lineáris elektrontranszportot (5.1. fejezet; Tóth és mtsai., 2009)

Megvizsgáltuk a három napig kénmentes tápoldatban, anaerob körülmények között tartott S-01 törzs lineáris elektrontranszport aktivitását. A 820 nm-es abszorpcióváltozásokkal azt figyeltük meg, hogy a  $P_{700}$  kezdeti gyors oxidációt egy drasztikusan lassú re-redukció

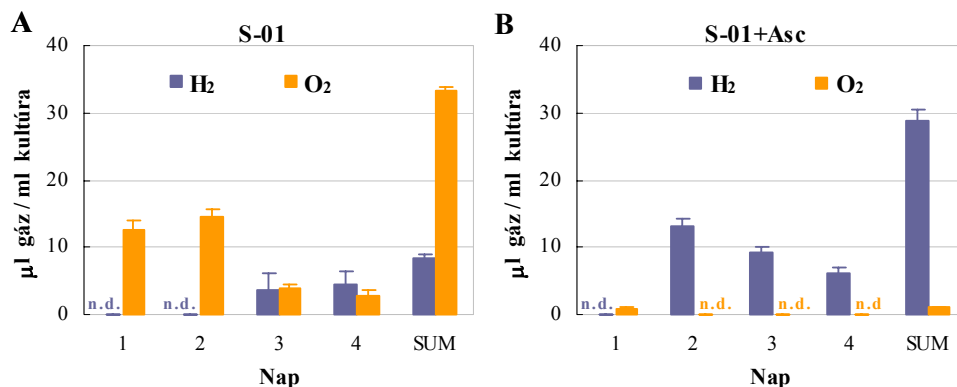
követette, amely aszkorbát (10 mM) hozzáadásával jelentősen felgyorsult (25C ábra) és DCMU-val szintén gátolható volt, ugyanúgy, mint hőkezelés esetében (25B ábra). Ezen eredmények alapján arra következtettünk, hogy három nap kénmegvonás után is még vannak működőképes PSII reakciócentrumok, amelyeknek az aszkorbát – mint elektrondonor – elektronokat szolgáltat, fenntartva ezáltal a lineáris elektrontranszport működését.



**25. ábra.** A külsőleg hozzáadott aszkorbát (Asc; 10 mM) és a DCMU (20  $\mu$ M) hatása a fényindukált 820 nm-es abszorpciós transziensekre normál körülmények között (TAP tápoldat (+S), aerob módon; A), hőkezelt (45 °C, 5 min; B) és három napon át kénmentes tápoldatban (-S), anaerob körülmények között tartott (C) *C. reinhardtii* kultúrában. A görbék öt független mérés átlagából készültek.

### 5.3.2. Az aszkorbát hatása *Chlamydomonas reinhardtii* törzsek hidrogéntermelésére

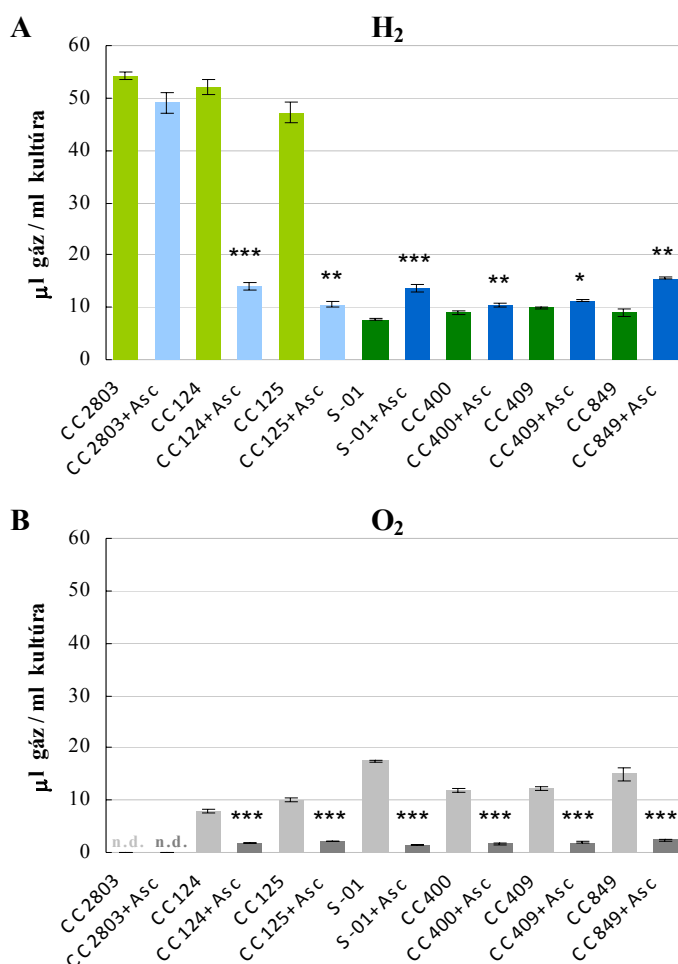
Az aszkorbátnak a hidrogéntermelésre gyakorolt hatását gázkromatográfiás mérésekkel (lásd 4.2.2.10. fejezet) követtük nyomon négy napon át tartó kénmegvonás során. Megfigyeltük, hogy a csak kénmegvonást kapott kultúra esetében az  $O_2$  még a negyedik napon is detektálható volt, azonban a mennyisége a kénmegvonás előrehaladtával egyre



**26. ábra.** A kontroll (A) és az aszkorbáttal (+Asc; 10 mM; B) kezelt S-01 *C. reinhardtii* törzs  $H_2$  termelésének és  $O_2$  mennyiségének változása kénmegvont, anaerob körülmények között. SUM - a naponta termelt hidrogén (A) és a jelenlévő oxigén (B) összege; n.d. - nem detektálható. A feltüntetett értékek tíz-tizenkét független mérés átlagából készültek és szórásként az SE van feltüntetve.

csökkent, és vele párhuzamosan a megtermelt  $H_2$  mennyisége megnövekedett. Az aszkorbáttal kezelt mintákban az  $O_2$  mennyisége már a kénmegvonást követő első napon drasztikusan lecsökkent, és a teljes anaerobicitás már a második napon kialakult. A hozzáadott aszkorbát (10 mM) hatására a  $H_2$ -termelődés hamarabb beindult, és négy nap alatt közel háromszor annyi  $H_2$  termelődött, mint a kontroll mintában. Tehát az aszkorbát egyrészt csökkentette az  $O_2$  mennyiségét a légtérben, másrészt stimulálta a  $H_2$ -termelést az S-01 törzs esetében.

Az aszkorbát hatását más, az irodalomból ismert hidrogéntermelésre használt *C. reinhardtii* törzsek esetében is megvizsgáltuk (27A ábra). Azt tapasztaltuk, hogy egyes törzseknél (CC-849, CC-400, CC-409) hasonlóan, mint az előzőekben ismertetett S-01 törzs esetében az aszkorbát serkenti a  $H_2$  termelést, míg más törzseknél (CC-124, CC-125,



**27. ábra.** Az aszkorbát hatása hét különböző *C. reinhardtii* törzs  $H_2$ -termelésére (A) és az  $O_2$  mennyiségének változására (B) négynapos kénmegvonás során. A feltüntetett értékek három-öt független mérés átlagából készültek és szórásként az SE van feltüntetve. A \*, \*\*, \*\*\* jelölt aszkorbáttal kezelt minták szignifikáns különbséget mutatnak a saját kezeltetlen kontrolljukhoz képest  $p < 0,05$   $p < 0,01$  és  $p < 0,001$  értékek mellett.

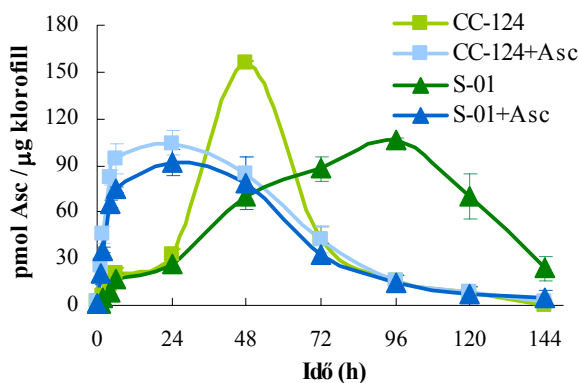
CC-2803) csökkenti azt. Minden törzs esetén megfigyeltük, hogy az aszkorbát erősen lecsökkentette az  $O_2$ -termelődést (27B ábra), ezáltal gyorsította a kultúra anaerobbá válását, ami abból következhet, hogy az aszkorbát befolyásolja az OEC működését.

A további vizsgálatainkhoz az eddig is használt S-01 törzs mellé kiválasztottunk egy olyan törzset – név szerint a CC-124-et, amelyben az aszkorbátkezelés hatására csökkent a kultúra  $H_2$ -termelése.

### 5.3.3. Az aszkorbát mennyiségének változása kénmegvonás során

Az S-01 és a CC-124-es kultúrák aszkorbát tartalmát a kénmegvonás során HPLC méréssel határoztuk meg (lásd 4.2.2.2. fejezet), hogy meggyőződjünk arról, hogy az általunk használt aszkorbátkezelés (10 mM) élettanilag releváns-e.

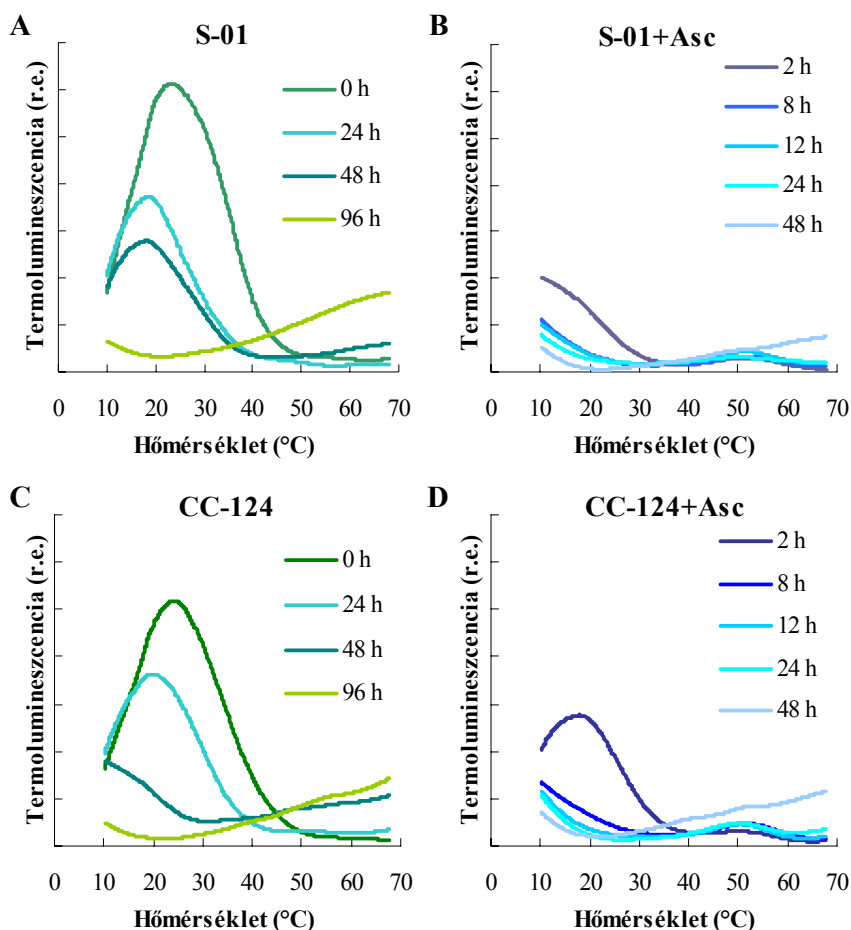
Mindkét törzs esetében a kénmegvonás hatására erőteljesen megnövekedett az aszkorbát bioszintézis: az aszkorbát koncentrációja kb. 100-szorosára emelkedett a kiindulási értékéhez képest (28. ábra). A maximális aszkorbátszint a CC-124 törzsnél a kénmegvonás második napján, míg az S-01 törzsnél a negyedik napon jelentkezett. Mindkét törzs esetében a 10 mM-os aszkorbátkezelés után 8 órával már kialakult a maximális aszkorbátkoncentráció (28. ábra), ami nagyon hasonló volt a kontroll sejtekben mért maximális aszkorbátértékhez. A sejtszám és a sejttérfogat alapján kiszámoltuk az aszkorbát sejten belüli koncentrációját is; ami a CC-124 sejtekben kb. 50  $\mu$ M-ról 3 mM-ra, míg az S-01 törzsben kb. 20  $\mu$ M-ról 1 mM-ra emelkedett.



**28. ábra.** Kontroll és aszkorbáttal (+Asc; 10 mM) kezelt S-01 és CC-124-es *C. reinhardtii* törzsek aszkorbát tartalmának alakulása a kénmegvonás során. Az ábrán a kultúra aszkorbát tartalma a klorofilltartalomra vonatkoztatva van feltüntetve. A feltüntetett értékek három független mérés átlagából készültek és szórásként az SE van feltüntetve.

### 5.3.4. Az aszkorbát hatása a vízbontó komplexre

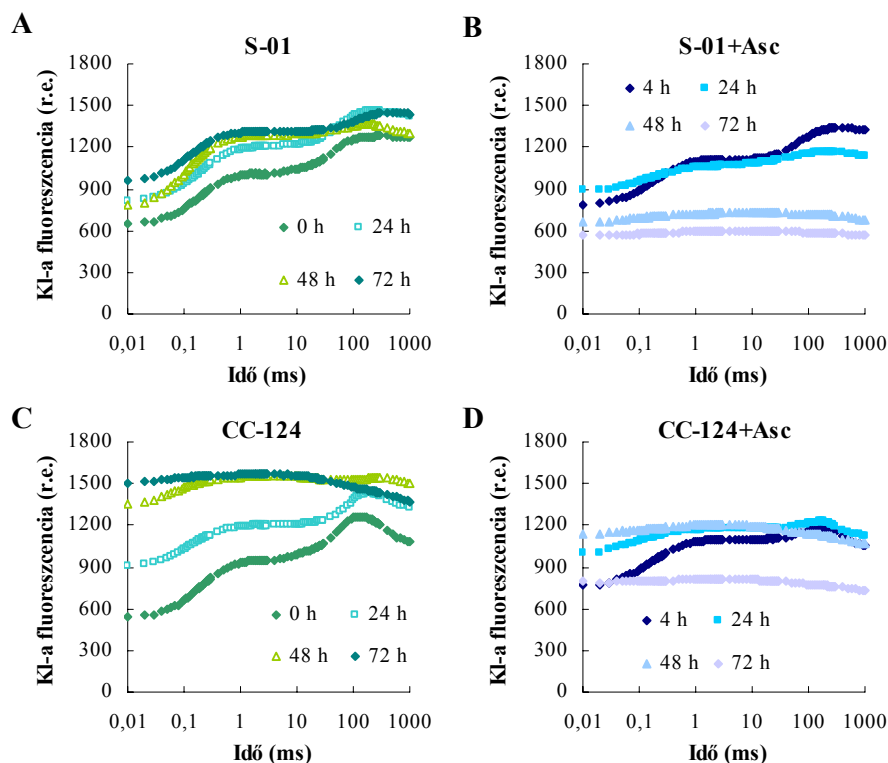
Az előzőekben megfigyeltük, hogy a külsőleg hozzáadott aszkorbát hatására az  $O_2$  mennyisége jelentősen csökkent a légtérben (27B ábra), ami felveti annak a lehetőségét, hogy az aszkorbát befolyásolja az  $O_2$  termelést; ezért TL mérésekkel (lásd 4.2.2.8. fejezet) megvizsgáltuk az aszkorbát OEC-re gyakorolt hatását a kénmegvonás során. Mindkét törzs esetén azt figyeltük meg, hogy a kénmegvonás előrehaladtával a B sáv, ami az OEC aktivitásáról nyújt információt, fokozatosan eltolódott az alacsonyabb hőmérséklet felé, intenzitása csökkent, majd teljesen eltűnt (29A, C ábra). Az aszkorbátkezelés hatására a B sáv intenzitása mindkét törzsben már két óra után kb. 70%-kal csökkent és a 8. órára már szinte el is tűnt (29B, D ábra). Ennek valószínűleg az a magyarázata, hogy aszkorbát redukálja az OEC Mn-centrumát, így módon megszüntetve a vízbontó aktivitáshoz rendelt  $S_2$  és  $S_3$  állapotokat, és ezzel az  $O_2$ -termelést is. Fontos megjegyezni, hogy a B sáv eltűnése szorosan korrelál a



**29. ábra.** Kontroll (A, C) és aszkorbáttal (+Asc; 10 mM; B, D) kezelt S-01 és CC-124-es *C. reinhardtii* törzsek B termolumineszcencia sávjának intenzitása négynapos kénmegvonás során. A görbék öt-hat független mérés átlagát mutatják.

maximális aszkorbátszint elérésével mind az aszkorbátkezelt, mind a kontroll mintákban (28. ábra). Mindkét aszkorbáttal kezelt törzs esetében a B sáv csökkenésével párhuzamosan 50 °C környékén megjelent a C sáv, amely a  $\text{Ty}_{\text{D}}^+$  és a  $\text{Q}_{\text{A}}^-$  rekombinációjának eredménye (Ducruet, 2013).

OJIP mérésekkel (lásd. 4.2.2.5. fejezet) is megvizsgáltuk az aszkorbát PSII-re gyakorolt hatását a kénmegvonás során. Megfigyeltük, hogy mindkét kontroll és aszkorbáttal kezelt törzsben a kénmegvonás előrehaladtával fokozatosan emelkedett az  $F_0$  érték (30. ábra), ami a CC-124-es törzsben volt az erőteljesebb (30C ábra), ami arra utal, hogy a PQ pool erőteljesen redukált, tehát más forrásból is, pl. a klororespiációból jönnek elektronok, amelyek redukálják a PQ poolt és a primér kinon akceptort ( $\text{Q}_{\text{A}}$ -t). Mindkét törzsnél az aszkorbátkezelés után kb. három nappal erőteljes  $F_{\text{m}}$  érték csökkenést (30B, D ábra) is megfigyeltünk, ami a PSII reakciócentrumok leépülésére utal.

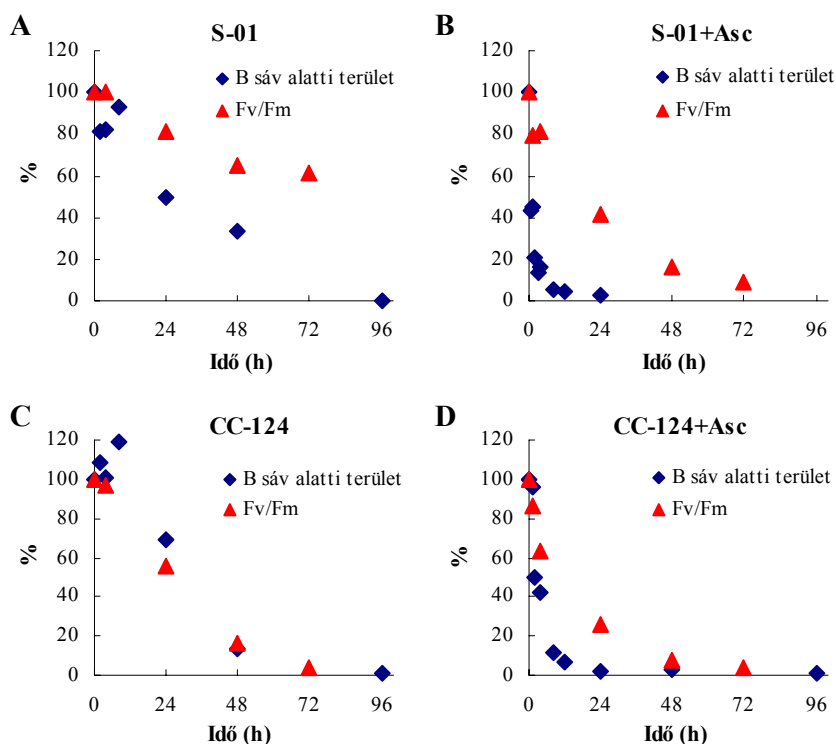


**30. ábra.** Kontroll (A, C) és aszkorbáttal kezelt (+Asc; 10 mM; B, D) S-01 és CC-124-es *C. reinhardtii* törzsek gyors klorofill-a fluoreszcencia indukciója négynapos kénmegvonás során. A görbék három független mérés átlagát mutatják.

A TL és OJIP mérések együtt (31. ábra) azt mutatták, hogy mindkét aszkorbáttal kezelt törzs esetében az OEC-aktivitást jelző B sáv gyorsan, kb. 8 óra alatt lecsökkent. Mivel az  $F_v/F_m$  érték továbbra is mérhető volt (31B, D ábra), valószínű, hogy a PSII reakciócentrumok bizonyos hányada aktív maradt még kb. 1-2 napig. Ez lehetővé teszi azt,



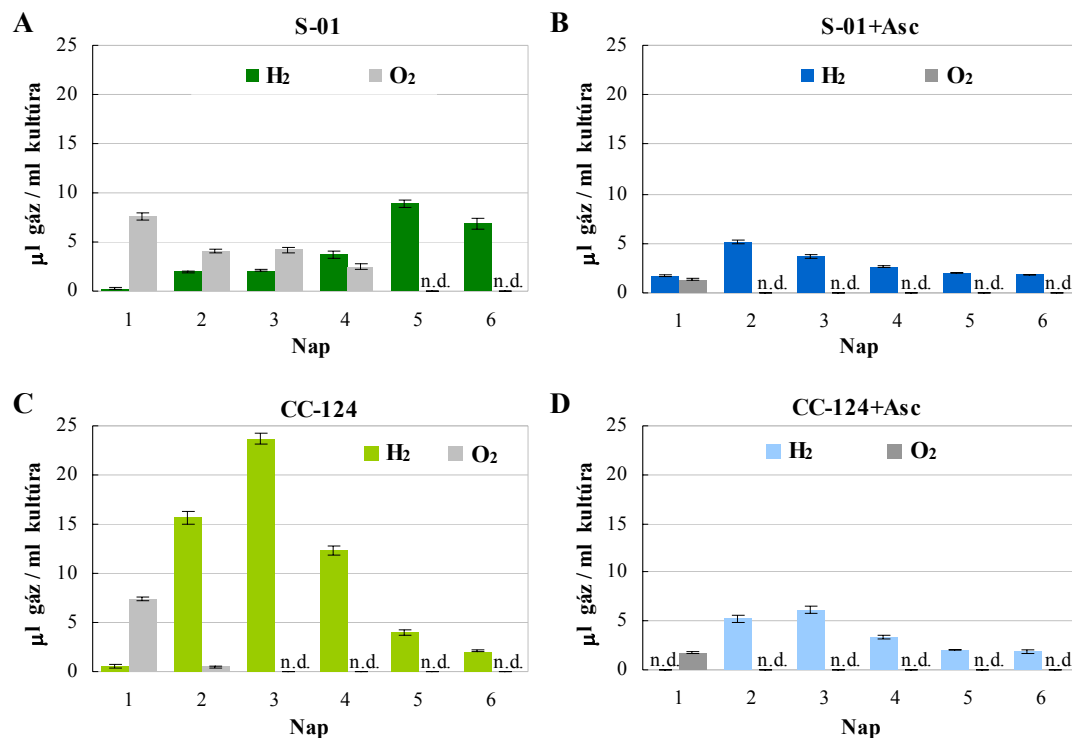
hogy az aszkorbát mint alternatív donor elektronokat szolgáltatson a PSII számára és a keményítőbontásból jövő elektronokkal együtt hozzájáruljon a  $H_2$ -termeléshez. Kezeletlen S-01 törzsben a B sáv valamivel előbb csökkent le, mint az  $F_v/F_m$  érték (31A ábra). A CC-124-es kultúrában ez a két paraméter szinte egyszerre változott (31C ábra), azonban elképzelhető, hogy ennek az az oka, hogy ebben a törzsben a klororespirációs aktivitás erősebb és az  $F_v/F_m$  érték csökkenését valójában az  $F_0$  érték emelkedése okozza.



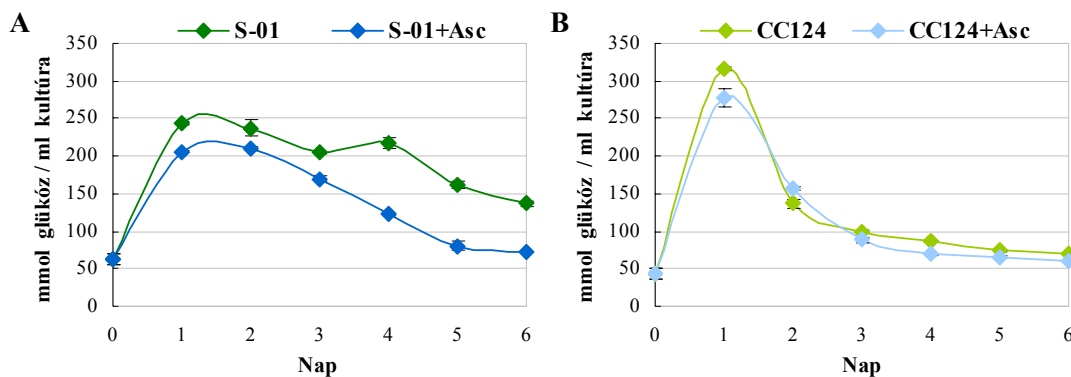
**31. ábra.** Kontroll (A, C) és aszkorbáttal (+Asc; 10 mM; B, D) kezelt S-01 és CC-124-es *C. reinhardtii* törzsek B termolumineszcencia sávjának és  $F_v/F_m$  értékének változása százalékosan kifejezve négynapos kénmegvonás során. A feltüntetett értékek három független mérés átlagát mutatják.

A két törzs  $H_2$ -termelésének és a szérumüvegben felhalmozódott  $O_2$  mennyiségének változását GC mérésekkel (lásd 4.2.2.10. fejezet) követtük és hasonlítottuk össze a kénmegvonás során (32. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a CC-124-es kultúra már a kénmegvonás 2. napján anaerobbá vált (32C ábra). Az S-01 kultúra csak napokkal később vált teljesen anaerobbá és akkor indult meg a  $H_2$ -termelés is (32A ábra). Az aszkorbát (10 mM) hozzáadása után egy nappal mindkét törzs esetében drasztikusan lecsökkent az  $O_2$  mennyisége, sőt a 2. napra a kultúrák teljesen anaerobbá váltak (32B, D ábra). Tehát a két különböző törzs esetében az aszkorbát hatása hasonló volt, illetve a megtermelt  $H_2$  mennyisége is közel azonos volt. Megvizsgáltuk azt is, hogy hogyan befolyásolja a kultúra  $H_2$ -termelését az, ha a klorofilltartalmát növeljük ( $30 \mu g$  klorofill  $ml^{-1}$ ). Ilyenkor megváltozik

a kultúra állapota, mivel jobban leárnýékolják egymást a sejtek és kevesebb lesz az egy sejtre jutó fotonok száma. Azt tapasztaltuk, hogy a kultúra anaerobbá válásának időpontja és a  $H_2$ -termelés folyamata nem változott, csak a megtermelt  $H_2$  mennyisége növekedett meg arányosan a klorofilltartalommal (adatok nem kerülnek bemutatásra).



**32. ábra.** Kontroll (A, C) és aszkorbáttal (+Asc; 10 mM, B, D) kezelt S-01 és CC-124-es *C. reinhardtii* törzsek  $H_2$ -termelésének és az  $O_2$  mennyiségének változása hatnapos kénmegvonás alatt. Az értékek tizenhárom-tizenöt független mérés átlagát mutatják és szórásként az SE van feltüntetve.



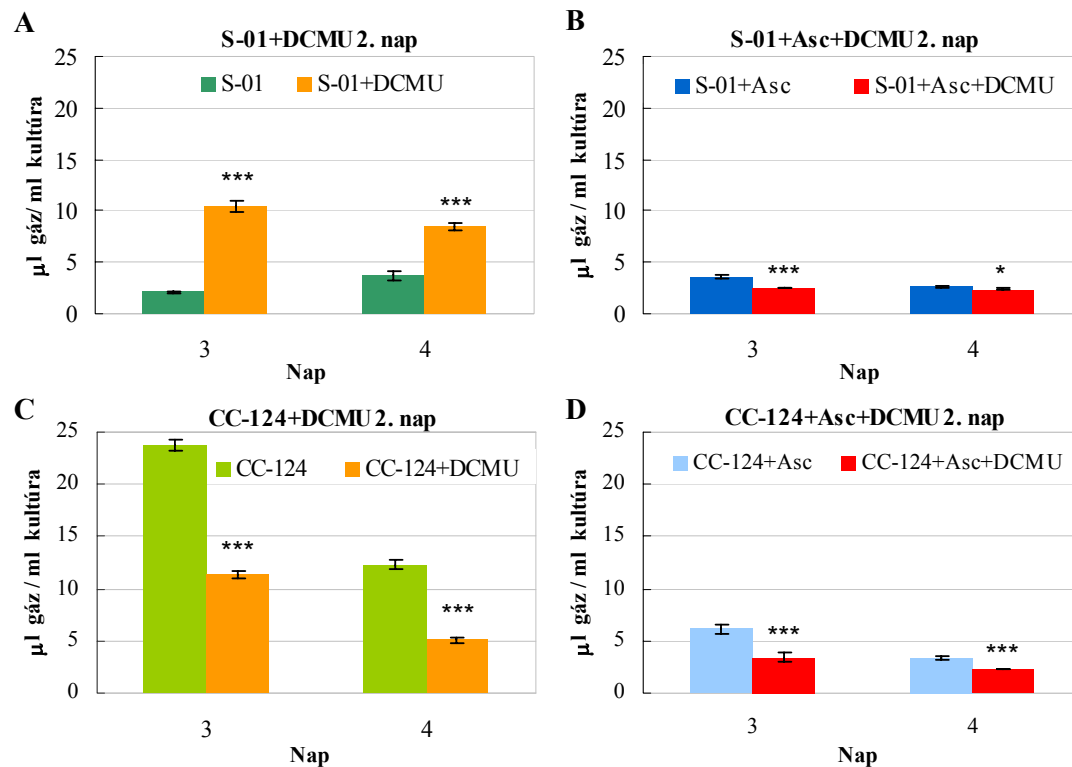
**33. ábra.** Kénmegvonás során a kontroll és aszkorbáttal (+Asc; 10 mM) kezelt S-01 (A) és CC-124-es (B) *C. reinhardtii* törzsek keményítőtartalmának változása. Aminoglükózidáz segítségével a minta keményítőtartalmát glükózzá hidrolizáltattuk, és annak a mennyiségét (mmol-ban) tüntettük fel az idő függvényében. Az értékek három független mérés átlagát mutatják és szórásként az SE van feltüntetve.

### 5.3.5. Az S-01 és CC-124 *Chlamydomonas reinhardtii* törzsek keményítőtartalmának alakulása a kénmegvonás során

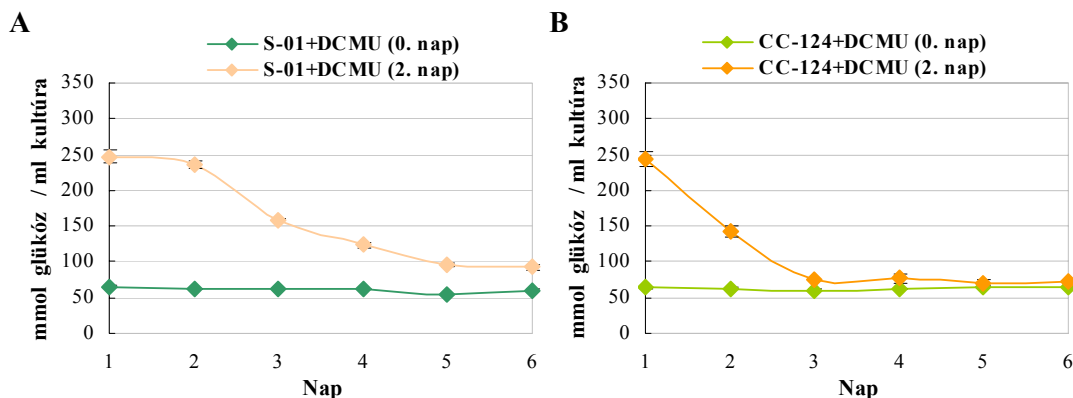
A lineáris elektrontranszportból jövő elektronok mellett a keményítőbontásból származó elektronok is jelentősen hozzájárulnak az elektrontranszportlánc redukciójához, ezáltal a  $H_2$ -termeléshez (Volgusheva és mtsai., 2013). Ezért megvizsgáltuk a kénmegvont sejtek keményítőtartalmának alakulását (lásd 4.2.2.3. fejezet) a  $H_2$ -termelés folyamata alatt. Ismert, hogy a kénmegvonást követő első pár órában erőteljesen megnövekedik a sejtek keményítőtartalma (Melis és mtsai., 2000, Fouchard és mtsai., 2005, Chochois és mtsai., 2009), ami az általunk vizsgált két törzs esetében is megfigyelhető (33. ábra). Az aszkorbáttal kezelt kultúrákban ez az érték valamivel (15%-kal) alacsonyabb volt, ami abból adódhat, hogy az OEC aktivitás már a kezelést követő 8 órában jelentős mértékben lecsökkent (29. ábra). A CC-124 törzsben a kénmegvonás második napján erőteljes keményítőtartalomcsökkenést figyeltünk meg, ami hatékony felhasználásra utal. Ez magyarázható azzal, hogy ebben a törzsben a légzés igen hatékony (Zhang és mtsai., 2002, Chochois és mtsai., 2009), ami gyors keményítő-felhasználással jár. A kénmegvonás előrehaladtával, amikor a kultúra már teljesen anaerobbá vált, lecsökkent a keményítő-felhasználás hatékonysága is. Ezzel szemben az S-01 törzsnél a kénmegvonás első négy napján lassú keményítő-felhasználást figyeltünk meg, ami később a kénmegvonás előrehaladtával fokozódott. Ez az erőteljesebb keményítő-fogyás a negyedik-ötödik napra tehető és egybeesik a  $H_2$ -termelés beindulásával. Az aszkorbáttal kezelt S-01 kultúra esetében a kénmegvonás harmadik napjától vált hatékonyabbá a keményítő felhasználás.

Irodalmi adatokból ismert, hogy ha a kénmegvonás kezdetekor DCMU-t adunk a kultúrához, nem termelődik  $H_2$ , ami egyrészt a blokkolt lineáris elektrontranszportnak, másrészt a keményítő-felhalmozódás gátlásának tulajdonítható (Fouchard és mtsai., 2005). A lineáris elektrontranszport és a keményítőbontás hozzájárulását a  $H_2$ -termeléshez oly módon vizsgáltuk meg, hogy a DCMU-t a keményítő felhalmozás megtörténte és a  $H_2$ -termelés beindulása után, tehát a kénmegvonás második napján adtuk a kultúrához. Az S-01 törzs esetében azt figyeltük meg, hogy a DCMU hatására megszűnt  $O_2$ -termelés miatt a hidrogénázra ható gátlás eltűnt és megemelkedett a  $H_2$ -termelés (34A ábra). Ilyenkor a  $H_2$ -termeléshez szükséges elektronok csak a keményítőbontásból származnak. Ezt alátámasztja az is, hogy a kénmegvonás második napján történő DCMU adása után a keményítőfelhasználás fokozódott a kontroll képest (33A és 35A ábra). A CC-124-es törzs esetében a kénmegvonás második napján adott DCMU a felére csökkentette a  $H_2$ -termelést (34C ábra), ami azt jelenti, hogy a kénmegvonás harmadik napján is még az elektronok jelentős része a PSII felől érkezik

a hidrogenázhoz. A DCMU hozzáadás után a CC-124 törzs esetében is valamennyivel fokozódott a keményítőfelhasználás a kontrollhoz képest (35B és 33B ábra). Mindkét aszkorbát-kezelt kultúrában a kénmegvonás második napján adott DCMU csökkentette a H<sub>2</sub>-termelést (34B, D ábra). Ez mutatja, hogy az elektronok kb. 1/3 a PSII felől érkezett a



**34. ábra.** A kénmegvonás második napján DCMU-val (20 μM) kezelt kontroll és aszkorbát-kezelt (+Asc; 10 mM) S-01 és CC-124-es *C. reinhardtii* kultúrák H<sub>2</sub>-termelése a kénmegvonás harmadik és negyedik napján. A kontroll (S-01, S-01+Asc, CC-124, CC-124+Asc) értékek tizenhárom-tizenöt, a DCMU-val kezelt minták esetében bemutatottak három-öt független mérés átlagát mutatják és szórásként az SE van feltüntetve. A \*,\*\*\* jelölt DCMU kezelt minták szignifikáns különbséget mutatnak a saját kezeletlen kontrolljukhoz képest p<0,05 és p<0,001 értékek mellett.

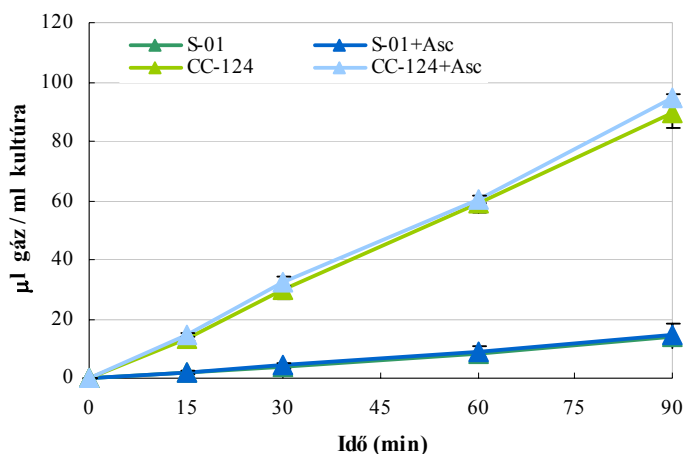


**35. ábra.** A kénmegvonással egyidőben (0. nap) és a kénmegvonás második napján DCMU-val (20 μM) kezelt S-01 (A) és CC-124 (B) *C. reinhardtii* törzsek keményítőtartalmának változása a hidrogéntermelés folyamata során. Az értékek három független mérés átlagát mutatják és szórásként az SE van feltüntetve.

hidrogenázhoz, viszont ilyenkor már nem figyelhető meg OEC aktivitás (31B és D ábra) az aszkorbát kezelt mintákban. Ez bizonyítja, hogy az aszkorbát alternatív PSII elektrondonorként viselkedik a H<sub>2</sub>-termelés folyamán.

### 5.3.6. Az S-01 és CC-124 *Chlamydomonas reinhardtii* törzsek *in vitro* hidrogenáz aktivitása

*In vitro* is megvizsgáltuk a hidrogenáz enzim aktivitását (lásd 4.2.2.11. fejezet). Ehhez két napig kénmegvonás alatt tartott kultúrát használtunk fel, mert eddigre a kontroll S-01 kivételével minden kultúra anaerobbá vált (32. ábra). Megfigyeltük, hogy a CC-124-es törzs majdnem 10-szer nagyobb hidrogenáz-aktivitással rendelkezett, mint az S-01 törzs (36. ábra). Látható az is, hogy az aszkorbáttal kezelt kultúrában a hidrogenáz ugyanolyan aktivitást mutatott, mint a kontroll. Illetve, ha az aszkorbátot közvetlenül a mérés előtt a reakcióelegyhez tettük, az sem befolyásolta a hidrogenáz aktivitást (az adatok nem kerülnek bemutatásra). Megvizsgáltuk a négy napig kénmegvonás alatt tartott S-01 kultúra hidrogenáz aktivitását is, ilyenkor már ez a kultúra is teljesen anaerobá válik, de nem figyeltünk meg eltérést a kettő és négy napos kénmegvont kultúra hidrogenáz aktivitásában (az adatok nem kerülnek bemutatásra).



**36. ábra.** Két napos kénmegvont kontroll és aszkorbát-kezelt (+Asc; 10 mM) S-01 és CC-124-es *C. reinhardtii* kultúrák *in vitro* hidrogéntermelése. Az értékek három független mérés átlagát mutatják és szórásként az SE van feltüntetve.

## 6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

### 6.1. Az aszkorbát a PSII alternatív elektrondonora

Kísérleteinkkel sikerült bebizonyítanunk, hogy az aszkorbát a PSII alternatív elektrondonora. A gyors fluoreszcencia görbe K lépésének regenerációja jellemzi a PSII felé érkező elektronátadás sebességét (Tóth és mtsai., 2007a). Megállapítottuk, hogy a hőkezelt levelekben a K lépés regenerációja függ az aszkorbáttartalomtól: vad típusú *A. thaliana* növényekben az elektronátadás félideje ( $t_{1/2}$ ) kb. 25 ms, míg aszkorbát-hiányos mutánsokban ez kb. 55 ms volt (10B ábra).

A PSI-hez tartó aszkorbát-függő elektrontranszport DCMU-érzékenysége is azt jelzi, hogy az aszkorbát a PSII elektrondonora (11. ábra). A leveken és tilakoidmembrán-szuszpenzió végzett TL mérésekből kiderült, hogy az aszkorbát közvetve vagy közvetlenül a  $\text{Tyr}_Z^+$ -hez juttatja az elektronokat (12. ábra).

Az aszkorbát a kloroplasztiszban 25-50 mM-os (Eskling és Åkerlund, 1998; Smirnov, 2000), a tilakoidmembrán lumenében feltételezhetően kb. 4 mM-os (Foyer és Lelandais, 1996) koncentrációban van jelen. Mano és mtsai. (1997) *in vitro* méréssel meghatározták, hogy az aszkorbát-függő elektronáramlás által kb. 40  $\mu\text{mol NADPH (mg Chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  redukálódik 10 mM aszkorbát jelenlétében, ami kb. a fele annak az elektrontranszport sebességnek, amit aktív OEC-vel rendelkező tilakoidmembrán-szuszpenzió mértek.

Mano és mtsai. (1997) *in vitro* munkájából az is kiderült, hogy az aszkorbát elektronokat tud szolgáltatni a PSI számára is abban az esetben, ha a PSII felőli elektrontranszport DCMU-val blokkolt és az aszkorbát koncentráció viszonylag magas (50 mM). Ivanov és mtsai. (2001) a kukorica (*Zea mays*) mezofill és hüvelyparenchima sejtjeinek tilakoidmembránján végzett kísérleteikből megállapították, hogy az aszkorbát hozzájárul a PSI körüli ciklikus elektrontranszporthoz. Méréseink alapján azt a következtetést vontuk le, hogy fiziológiai körülmények között, *A. thaliana* levelekben nem figyelhető meg közvetlen elektronátadás az aszkorbát és a PSI között (11. ábra).

Elképzelhető, hogy az aszkorbát mellett más molekula is szolgálhat alternatív elektrondonorként. Ilyen lehet esetleg a glutation, de a hidrogén-peroxid is képes elektronokat szolgáltatni a PSII számára, de csak extrém magas (mM-os) koncentráció esetén (Pan és Izawa, 1979). Alternatív elektrondonorként tud szolgálni a PSII számára a cisztein is (Katoh és San Pietro, 1967), azonban a lumen szabad ciszteintartalma nagyon kicsi. De Ronde és mtsai. (2004) felvetették, hogy a prolin is képes elektronokat szolgáltatni a PSII-nek.

Az aszkorbátnak a PSII-höz való affinitása fajonként eltérő lehet és mivel az alkalmazott hőkezelés különböző szerkezeti változásokat idézhet elő a PSII donor oldalán (pl.

leválnak a külső proteinek és szabaddá válnak a Mn-, Cl- és Ca-ionok), az aszkorbát hozzáférése a PSII-höz eltérő lehet a különböző hőkezelések után. Továbbá az alternatív elektronátadás sebessége nagymértékben függ a növények aszkorbáttartalmától, ami viszont igen változó, a mennyiségét befolyásolhatja pl. a nevelési fény intenzitása (Grace és Logan, 1996; Eskling és Åkerlund, 1998), a cirkadián ciklus (Kiyota és mtsai., 2006), a növények kora (Tóth és mtsai., 2009) és a stressz körülmények (Castillo és Greppin, 1988; Horemans és mtsai., 2000).

A természetben ritkán fordul elő olyan magas hőmérsékletű hőstressz (48-50 °C), amelyet mi alkalmaztunk annak érdekében, hogy az OEC-t teljesen inaktíváljuk. Ezen hőkezeléssel az volt a célunk, hogy megvizsgáljuk, hogy az aszkorbát képes-e PSII elektrondonorként viselkedni, és meghatározzuk az elektronátadás félidejét. Az oxigénfejlődés részleges inaktivációját viszont gyakran okozza hőstressz. Havaux (1993) leírta, hogy a paradicsom (*Solanum tuberosum*) növényben az OEC inaktivációja viszonylag alacsony hőmérsékleten megtörténik, már 39 °C-on az OEC-k 50%-a inaktíválódik, viszont a PSII reakciócentrumok 50%-ának inaktivációjához sokkal magasabb hőmérséklet szükséges. Azon kísérleteinkben is megfigyelhető volt az aszkorbát-függő elektrontranszport, ahol a leveleket enyhe hőkezelésnek (13. ábra) vetettük alá és az OEC aktivitása kb. a felére csökken. Ezen eredmények bizonyítják, hogy az aszkorbát fiziológiai körülmények között is a PSII alternatív elektrondonora.

## 6.2. Az aszkorbát PSII alternatív elektrondonorként betöltött élettani szerepe

Mano és mtsai. (1997) korábbi *in vitro* kísérletekben tanulmányozták az alternatív elektrondonorok fiziológiai jelentőségét, és felvetették, hogy ezek megvédhetik a PSII reakciócentrumot a fotooxidációval szemben. A védelem foka és hatékonysága több tényezőtől függhet, pl. a károsodás mértékétől, az aszkorbát koncentrációjától, a helyreállítás hatékonyságától, a fényintenzitástól, stb.

Kísérleteinkben a hővel inaktívált OEC-vel rendelkező vad típusú, *vtc2-3* és *miox4 A. thaliana* leveleket SSTF-el történő fénykezelésnek tettük ki. Megfigyeltük, hogy a reakciócentrumok több tízezer fényimpulzust is kibírnak károsodás nélkül – amennyiben az aszkorbáttól érkező elektronok által a Tyr<sub>Z</sub><sup>+</sup> teljesen re-redukálódni tud (17. ábra).

Ha a két SSTF közötti sötét szakasz nem elég hosszú (a vad típus és a *vtc2-3* mutáns esetében kevesebb, mint 100 és 200 ms) akkor a K lépés nem tud teljes mértékben regenerálódni, így a fényimpulzusok hatására a K csúcs amplitúdója fokozatosan csökken

(17. ábra). Ez a csökkenés nagymértékben irreverzibilis, néhány perc alatt bekövetkezhet, és függ a levelek aszkorbát-tartalmától (17C ábra).

Folyamatos megvilágítás ( $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűség) mellett a K csúcs amplitúdója erőteljesen lecsökken, a vad típusban és *vtc2-3* mutánsban 1,2 és 2,8 min, míg *miox4* levelekben 4,1 perces félidővel (18B ábra). A variábilis fluoreszcencia DCMU jelenlétében 1 óra megvilágítás után is jelentősen magasabb, mint DCMU hiányában (18A és C ábra), ami arra utal, hogy a PSII reakciócentrumokon belül még működik a töltésszétválasztás, habár a megvilágítás alatt a fluoreszcencia indukció kinetikája fokozatosan lassult. A K lépés intenzitásának csökkenését és a fluoreszcencia indukció kinetikájának lassulását (18A ábra) valószínűleg az okozza, hogy a Tyr<sub>Z</sub> és a P<sub>680</sub><sup>+</sup> közötti elektronátadás lelassul; hasonló következtetésre jutott Callahan és Cheniae (1985) hidroxilaminnal kezelt levelek esetében és ezt mutatják Blubaugh és mtsai. (1991) korábban végzett elektron paramágneses rezonancia (EPR) vizsgálatai is. A K lépés eltűnése, és a DCMU jelenlétében mért viszonylag magas F<sub>m</sub> érték (18D ábra) azt mutatják, hogy a Tyr<sub>Z</sub> és a P<sub>680</sub><sup>+</sup> közötti kb. 100 ns-os sebességgel történő elektronátadás hőkezelt leveleknél fénykezelés hatására néhány száz  $\mu\text{s}$ -ra lassul le, így hasonló lesz a Q<sub>A</sub> és a Q<sub>B</sub> közötti elektronátadás sebességéhez.

Ismert, hogy hőkezelés hatására a Q<sub>A</sub> és a Q<sub>B</sub> közötti elektrontranszport is lelassulhat (Ducruet és Lemoine, 1985). Az OEC sokkal érzékenyebb a magas hőmérsékletre, mint a PSII akceptor oldala, a Q<sub>A</sub>-tól a Q<sub>B</sub> felé történő elektronátadás 42 °C alatti hőmérsékleten nem károsodik (Pospíšil és Tyystjärvi, 1999), így nem alakul ki az akceptor-oldali fotoinhibíció. Adataink is azt mutatják, hogy hőkezelt (40 °C, 15 min) levelekben DCMU jelenlétében sokkal magasabb az F<sub>m</sub> érték, mint anélkül, ebből arra következtetünk, hogy a PSII donor-oldala sérült – így a donor-oldal a limitáló tényező. A hőstresszt követő megvilágítás hatására P<sub>680</sub><sup>+</sup> és Tyr<sub>Z</sub><sup>+</sup> halmozódik fel, amelyek oxidáló hatása miatt a PSII károsodik. A reakciócentrumok károsodása sokkal erősebb a *vtc2-3* mutánsban, mint a vad típusban (18D ábra). Ha az aszkorbát-hiányos leveleket aszkorbát oldatban inkubáljuk, a hőkezelt levelekben a fénykezelés hatására a PSII reakciócentrumok inaktiválódása lassabban következik be, mint a *vtc2-3* kontroll levelekben. Emellett DPC-kezelést is végeztünk, amely egy szabadgyök-kioltó hatással nem rendelkező mesterséges PSII alternatív donor, és ebben az esetben is lassabb PSII inaktiváció volt megfigyelhető (19B ábra), ami bizonyítja, hogy az alternatív elektrondonorok közreműködnek a PSII reakciócentrumok fotoprotekciójában (Tóth és mtsai., 2011).

A western blot eredményeink mutatják, hogy a hőkezelt levelekben a fénykezelés hatására nem csak a D1 fehérje, hanem párhuzamosan a CP43 és a PsbO fehérjék mennyisége



is csökken (22. ábra), ellentétben az akceptor-oldal által indukált fotoinhibícióval, ahol a fehérjék degradációja csak a D1 proteinre korlátozódik (Schuster és mtsai., 1988; van Wijk és mtsai., 1994). A természetben a hőstressz általában együtt jár a magas fényintenzitással, így magas hőmérsékleten a PSII reakciócentrumok fotoinaktivációja nagy valószínűséggel bekövetkezik. Megfigyeltük, hogy az OEC részleges (38 °C, 15 min; 21. ábra) inaktivációja esetén is bekövetkezik a fotoinhibíció és mérsékelt hőkezelés (36 °C, 1 min) esetén sem figyelhető meg a PSII reakciócentrumok aktivitásának helyreállása az első egy órában. Ez azt mutatja, hogy ezek a folyamatok élettanilag elfogadható hőkezelés esetén is hasonló mechanizmussal játszódnak le a levelekben, mint a teljesen inaktivált OEC esetén.

A fotoinhibíciót követően a PSII reakciócentrumok aktivitásának helyreállítását vizsgálva jelentős különbséget figyeltünk meg az aszkorbát-hiányos, vad típusú és aszkorbát-tútermelő *A. thaliana* növények között (23. ábra). Ennek oka valószínűleg az aszkorbát alternatív elektrondonorként betöltött szerepe mellett a szabadgyök-semlegesítő hatásának is köszönhető, ugyanis fotoinhibíciós körülmények között szabadgyökök termelődnek (hidroxil gyökök és szuperoxid gyökök), amelyek nem csak a reakciócentrumokat károsítják, hanem a tilakoidmembrán más komponenseire is veszélyt jelenthetnek, sőt a helyreállási folyamatot is befolyásolhatják (Nishiyama és mtsai., 2006). Emellett az is elképzelhető, hogy az aszkorbát alternatív donorként funkcionál a PSII biogenezise során, ugyanis ismert, hogy a reakciócentrumok felépülése az első lépés, majd ezt követi a külső OEC fehérjék reakciócentrumokhoz történő kapcsolódása (Rokka és mtsai., 2005).

Bebizonyítottuk, hogy hőkezelt levelekben nevelési fényintenzitáson az aszkorbát, mint elektrondonor védi a PSII-t illetve lassítja a fotoinhibíció folyamatát, ezáltal a PSII inaktivációját. Vizsgálataink alapján sikerült azt is bebizonyítanunk, hogy az aszkorbát, mint a PSII alternatív elektrondonora, lassítja a PSII reakciócentrumok károsodását fotoinhibíciós körülmények között, ha az OEC inaktív.

Az aszkorbát transzportja a kloroplasztisz külső membránján keresztül viszonylag gyors és a koncentráció gyorsan kiegyenlítődik (Foyer és Lelandais, 1996); és valószínűleg hasonlóan gyors a kloroplasztisz és a tilakoidmembrán közötti aszkorbáttranszport is (Mano és mtsai., 2004). Az oxidált formában lévő aszkorbát elsősorban a Halliwell-Asada ciklusban tud redukálódni, de valószínűleg más folyamatok is hozzájárulnak az aszkorbát regenerációjához (Potters és mtsai., 2002).

### 6.3. Az aszkorbát *Chlamydomonas reinhardtii* hidrogéntermelésére gyakorolt hatása

A fotobiológiai  $H_2$ -termelés korunk egyik legígéretesebb megújuló energiaforrása. A *C. reinhardtii* zöldalga a PSI akceptor oldalán található hidrogenáz enzim segítségével  $H_2$ -termelésre képes, abban az esetben, ha az elektrontranszport-lánc redukált és a redukáló erő nem használik fel a  $CO_2$  asszimilációjához. A *C. reinhardtii* Fe-Fe típusú hidrogenáza nagyon érzékeny az  $O_2$ -re, ami jelentősen csökkenti a  $H_2$ -termelés hatékonyságát. Ennek kiküszöbölésére vezették be a kénmegvonás módszerét (Melis és mtsai., 2001), melynek következtében az  $O_2$ -termelésért felelős PSII reakciócentrumok fokozatosan inaktiválódnak, a gátló hatás megszűnik és beindul a  $H_2$ -termelés. Eltérő PSII aktivitással rendelkező D1 *C. reinhardtii* mutánsok  $H_2$ -termelésének vizsgálatakor megfigyelték, hogy a kisebb PSII aktivitás hatására az anaerobicitás gyorsabban kialakult, de kevesebb keményítő tudott felhalmozódni, így kevesebb  $H_2$  is termelődött (Makarova és mtsai., 2007). Tehát a PSII aktivitás nélkülözhetetlen a  $H_2$ -termelés korai szakaszában (Ghirardi és mtsai., 2000, Volgusheva és mtsai., 2013).

Megállapítottuk, hogy a növényekhez hasonlóan a *C. reinhardtii* sejtekben is, hővel inaktivált OEC jelenlétében az aszkorbát a PSII elektrondonoraként lineáris elektrontranszportot tart fenn (24. és 25. ábra). Ebből kiindulva a lehetséges biotechnológiai alkalmazhatóságot abban láttuk, hogy az aszkorbát elektronokat szolgáltat a PSII-n keresztül a hidrogenáz felé, de – a vízbontással ellentétben –  $O_2$  nem képződik.

Az aszkorbát alternatív elektrondonor szerepét kénmegvonás alatt tartott kultúrában is megfigyeltük (25C ábra). Emellett a gázkromatográfiás méréseinkből kiderült, hogy az S-01 *C. reinhardtii* törzsben a külsőleg hozzáadott 10 mM aszkorbát elősegítette a kultúra anaerobbá válását és kétszeresére növelte a  $H_2$ -termelést (26. ábra).

Az S-01 törzs mellett további hat másik, a  $H_2$ -termelés tanulmányozásában korábban felhasznált törzset is megvizsgáltunk. Megfigyeltük, hogy közülük egyesekben ugyanúgy, mint az S-01 törzsben, a külsőleg hozzáadott aszkorbát növelte, míg más törzsekben (pl. CC-124 esetén) az aszkorbát kezelés csökkentette a  $H_2$ -termelést (27A ábra), de a kultúrák légterében mért  $O_2$  mennyisége minden aszkorbáttal kezelt törzsben csökkent (27B ábra), ami azt jelzi, hogy az aszkorbát hatással van az  $O_2$ -termelésre.

Normál körülmények között a *C. reinhardtii* aszkorbáttartalma igen kicsi: ezek az alga sejtek kb. 100-szor kevesebb aszkorbátot tartalmaznak, mint a növényi sejtek (Gest és mtsai., 2013). Oxidatív stressz hatására azonban az aszkorbát mennyisége megnövekedhet (Urzica és mtsai., 2012). Megfigyeltük, hogy mindkét törzsben a kénmegvonás hatására a sejten belüli aszkorbát-koncentráció jelentősen megnőtt (28. ábra), illetve a 10 mM külsőleg hozzáadott

aszorbát jelentősen meggyorsította a maximális aszorbát-koncentráció kialakulását, amely nagyon hasonló volt a kezeletlen kultúrákban mért maximális értékhez. Ebből következik, hogy az általunk külsőleg hozzáadott 10 mM aszorbát élettanilag releváns, hasonló aszorbátszint alakul ki a kénmegvonás hatására is.

Mindkét kezeletlen kénmegvont törzsben a B termolumineszcencia sáv fokozatosan lecsökkent és közben eltolódott az alacsonyabb hőmérséklet felé (29A és C ábra), ami az S állapotok elektrokémiai potenciáljának megváltozására utal (Maslenkova és mtsai., 1999). Azonban aszorbátkezelés hatására mindkét törzsben a B sáv gyorsan eltűnt (29B és D ábra), ezzel párhuzamosan megjelent a C sáv, ami azt mutatja, hogy a Tyr<sub>D</sub> oxidált állapotban van (Fufezan és mtsai., 2007). Ez akkor következik be, ha az OEC inaktív. Minden esetben a B sáv eltűnése egybeesik a maximális aszorbátszint megjelenésével, ami alapján elképzelhető, hogy az aszorbát szükséges a kultúra anaerobbá válásához. Magasabb rendű növényekben az aszorbát akkor tud hozzáférni a Mn-centrumhoz és azt redukálni, ha az OEC külső fehérjét előzőleg kémiaiilag eltávolították (Tamura és mtsai., 1990). Elképzelhető, hogy *C. reinhardtii*-ban az OEC szerkezete némileg különbözik a magasabb rendű növényekétől, ami lehetővé teszi az aszorbát hozzáférését a Mn-komplexhez, azonban a mechanizmus pontos feltárása még további vizsgálatokat igényel.

Az O<sub>2</sub>-termelésen kívül a keményítőfelhalmozódásnak és a respirációnak is nagyon fontos szerepe van a H<sub>2</sub>-termelésben (Volgusheva és mtsai., 2013, Torzillo és mtsai., 2014). A keményítőfelhalmozódás hasonló az S-01 és a CC-124 törzs esetében (33. ábra), azonban az S-01 törzsben a keményítőfelhasználás jóval kevésbé hatékony, mint a CC-124-ben (33. ábra). Ez lehet az oka annak, hogy még a kénmegvonás negyedik napján is mérhető volt az O<sub>2</sub> jelenléte (32A ábra), ami részben gátolhatta a H<sub>2</sub>-termelést. Az S-01 törzsben a kénmegvonás előrehaladtával, a PSII aktivitásának megszűnésével beindult a H<sub>2</sub>-termelés. Amikor a kénmegvonás második napján történő DCMU-kezeléssel (34A ábra) gátoltuk a PSII felől érkező elektrontranszportot, megemelkedett a termelt H<sub>2</sub> mennyisége, ami azt jelzi, hogy az S-01 törzsben a respiráció alacsony hatékonysága miatt a H<sub>2</sub>-termelés csak igen alacsony PSII aktivitás mellett indulhat meg. Végző soron az S-01 törzs alacsony hatékonyságú H<sub>2</sub>-termelésének az oka a gyenge respiráció/keményítőfelhasználás.

Ezzel szemben a CC-124 törzsben hatékonyabb respiráció figyelhető meg. Ezt alátámasztja egyrészt az, hogy aktív vízbontás mellett is a kénmegvonás második napján a kultúra anaerobbá vált (32C ábra), illetve ezen törzs hatékonyabb keményítóbontás volt megfigyelhető (33B ábra). Így a vízbontásból jövő elektronok a keményítóbontásból származó elektronokkal együtt hatékony H<sub>2</sub>-termelést tesznek lehetővé. A kénmegvonás második napján történő DCMU-kezelés hatására 50%-kal csökken a törzs H<sub>2</sub>-termelése (34C

ábra), ami azt mutatja, hogy a kénmegvonás harmadik napján is az elektronok nagy része még PSII felől érkezik. Emellett az *in vitro* méréseinkből kiderült, hogy a CC-124 törzs hidrogenáz aktivitása 10-szer nagyobb, mint az S-01 törzsé.

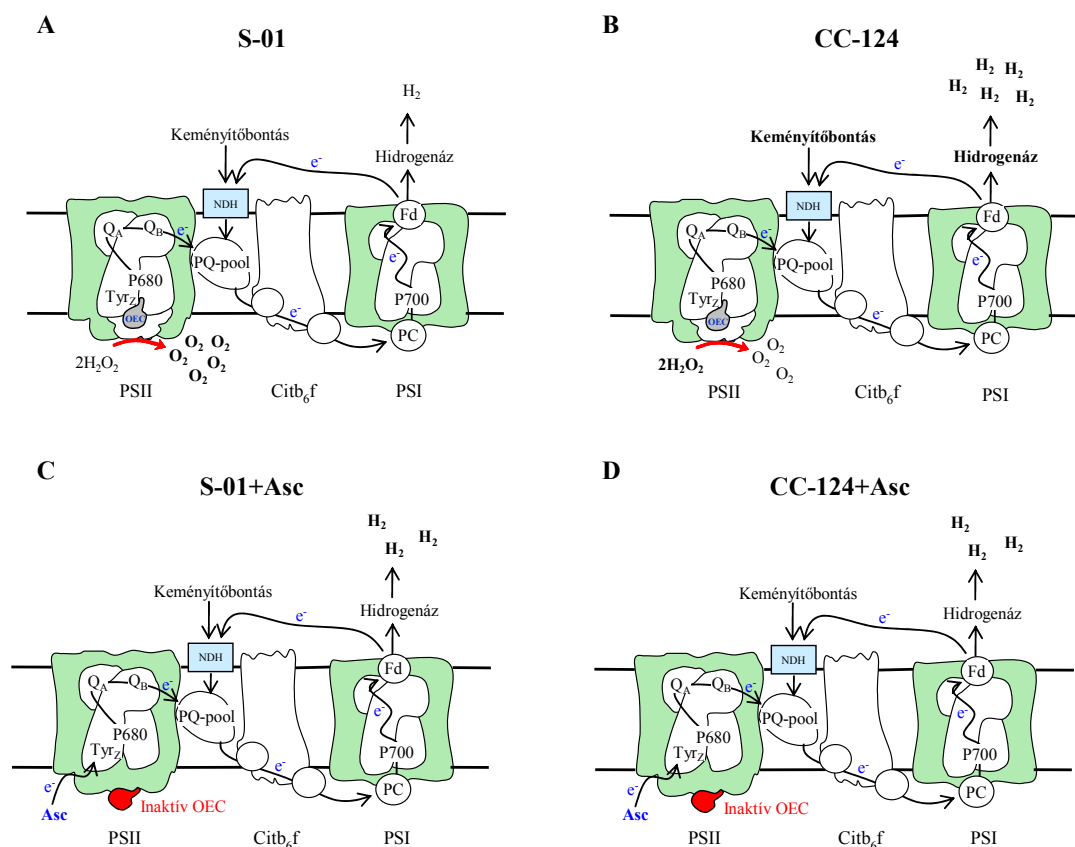
Aszkorbátkezelés hatására az anaerobicitás kialakulása és a megtermelt  $H_2$  mennyisége közel azonos volt a CC-124 és az S-01 törzsben (32B, D ábra), ami a CC-124-ben az aszkorbátkezelés nélküli mintákhoz képest csökkenést (32C és D ábra), míg az S-01 törzsben jelentős emelkedést jelent (32A és B ábra). Az aszkorbát ezen hatása az OEC aktivitására gyakorolt hatásából ered. Mindkét törzsben a hozzáadott aszkorbát hatására az OEC aktivitása gyorsan lecsökkent. Ez az S-01 törzsben serkentést okozott a  $H_2$ -termelésben az  $O_2$ -gátlás feloldása miatt, míg a CC-124 törzs  $H_2$ -termelését jelentősen csökkentette, mivel ezen törzs esetében a respirációban felhasználódik a PSII által termelt  $O_2$ , és az OEC gátlása jelentősen csökkenti a lineáris elektrontranszportot, ezáltal a megtermelt  $H_2$  mennyiségét.

Méréseinkből az is kiderült, hogy a kénmegvonás, és az azt kísérő oxidatív stressz (Toepel és mtsai., 2013) hatására az aszkorbát koncentrációja nagyon jelentősen, kb. 100-szorosára nő mindkét törzsben (28 ábra). Jelentős és gyorsan bekövetkező aszkorbát-bioszintézis emelkedést mások is mértek oxidatív stressz esetén (Urzica és mtsai., 2012), de annak mértéke az általunk mérthez képest jóval alacsonyabb volt. Fontos megjegyezni, hogy a maximális aszkorbát-szint kb. azonos volt a 10 mM-os aszkorbátkezelés és a kezeletlen minták esetében, a különbséget az jelentette, hogy a hozzáadott aszkorbát esetében a maximális szint már a 8. órában kialakult, míg a kezeletlen mintákban ez a 2. (CC-124) vagy a 4. (S-01) napon történt meg. A maximális aszkorbát koncentráció a sejteken belül 3 és 1 mM volt. Növények esetében korábban megfigyelték, hogy aszkorbátkezelés hatására jelentősen megemelkedett az aszkorbát-bioszintézis (Colville és Smirnov, 2008), ezért elképzelhető, hogy *C. reinhardtii* törzsekben is hasonló jelenséggel állunk szemben, ami megmagyarázná, hogy miért érünk el hasonló aszkorbát-szinteket aszkorbát hozzáadásával és anélkül.

Az aszkorbáttal kezelt mintákban egyértelműen kimutattuk, hogy az aszkorbát gátolja az OEC aktivitását, valószínűleg a Mn-centrum redukciója révén. Mivel a kénmegvonás során aszkorbátkezelés nélkül is hasonló koncentrációt mértünk, így elképzelhető, hogy az aszkorbátnak jelentős szerepe van az anaerobiózis kialakításban. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy a maximális aszkorbátszint kialakulása egybeesik az OEC aktivitás jelentős csökkenésével mindkét törzs esetében. Növényeken végzett vizsgálataink (5.2. fejezet) és korábbi irodalmi eredmények alapján tudjuk, hogy az OEC aktivitásának jelentős csökkenése donor-oldal által indukált fotoinhibíciót okoz, amely végső soron a fotoszintetikus apparátus leépüléséhez vezet. Eredményeink tehát felvetik annak a lehetőségét, hogy az

általánosan elfogadott vélekedés, amely szerint a kénhiány hatására a D1 turnover gátolt és ez vezet a fotoszintézis csökkenéséhez (Melis és Happe, 2001), módosításra szorul. E mechanizmus ellen szól az az érv is, hogy a kénmegvonás kezdete után már néhány órával nagyon jelentős génexpressziós változások figyelhetők meg (Zhang és mtsai., 2004; Toepel és mtsai., 2013) a sejtosztódás leáll, megindul a keményítő bioszintézise (Zhang és mtsai., 2002), azonban ennyi idő alatt még a D1 fehérje nem degradálódhat jelentősen, és valószínűleg jelentős kénhiány sem jelentkezik a sejten belül.

Tehát eredményeink alapján úgy tűnik, hogy az aszkorbátnak fontos szabályozó szerepe van a fotobiológiai  $H_2$ -termelésben, amely legalább részben az OEC-re gyakorolt hatásán keresztül nyilvánul meg. Ez a jelenség egy új lehetőséget kínálhat a PSII aktivitásának szabályozásában, ezáltal a *C. reinhardtii*  $H_2$ -termelésének hatékonyabbá tételében.



**37. ábra.** Kénmegvonás során a kontroll (A, B) és az aszkorbáttal (+10 mM Asc; C, D) kezelt S-01 és CC-124 *C. reinhardtii* törzsek hidrogéntermelésének sematikus ábrázolása. Az S-01 törzs (A) alacsony  $H_2$ -termelésének az oka a gyenge respiráció/keményítőfelhasználás, így a jelenlévő  $O_2$  részben gátolja a hidrogenáz működését. A CC-124 törzsnél (B) hatékonyabb respiráció/keményítőfelhasználás figyelhető meg. A vízbontásból jövő elektronok a keményítőtömbontásból származó elektronokkal együtt hatékony  $H_2$ -termelést valósítanak meg, illetve ezen törzs majdnem 10-szer nagyobb hidrogenáz-aktivitással rendelkezik. Mindkét törzsben a hozzáadott aszkorbát (C, D) hatására az OEC aktivitása gyorsan lecsökken. Ez az S-01 törzsben serkentést okoz a  $H_2$ -termelésben egyrészt az  $O_2$ -gátlás feloldása miatt, másrészt az aszkorbát elektronokat szolgáltatva a PSII-nek, fenntartja a lineáris elektrontranszportot és a keményítőtömbontásból jövő elektronokkal együtt hozzájárul a  $H_2$ -termeléshez. A CC-124 törzs esetében aszkorbátkezelés (D) egy kevésbé hatékony  $H_2$ -termelést eredményez, ami abból ered, hogy az aszkorbát kevésbé hatékony elektrondonor, mint a víz, így az OEC gátlása jelentősen csökkenti a lineáris elektrontranszportot, ezáltal a megtermelt  $H_2$  mennyiségét.

## 7. KÖVETKEZTETÉSEK

Az alternatív elektrondonor azonosítása érdekében végzett kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy:

- Ha az OEC inaktív, az aszkorbát a PSII elektrondonoraként viselkedik magasabb rendű növényekben és *C. reinhardtii* sejtekben is, *in vivo* körülmények között.
- Az aszkorbáttól az elektronok a PSII-höz a Tyr<sup>+</sup> közvetítésével jutnak el.
- Enyhe hőkezelés esetén is az aszkorbát a PSII alternatív elektrondonora.

A PSII alternatív elektrondonoraként működő aszkorbát élettani jelentőségét tisztázandó kísérleteink arra az eredményre vezettek, hogy:

- Az aszkorbát PSII donorként mérsékelten véd a donor-oldal által indukált fotoinhibícióval szemben.

Megállapítottuk, hogy az aszkorbát központi szerepet tölthet be a *C. reinhardtii* H<sub>2</sub>-termelésének a szabályozásában, mivel:

- *C. reinhardtii* sejtekben a kénmegvonás hatásra jelentősen megnövekszik a sejtek aszkorbátartalma, valamint 10 mM aszkorbát hozzáadása a kontroll kultúrához hasonló sejten belüli koncentráció kialakulásához vezet.
- Az aszkorbát elősegíti a kultúra anaerobbá válását azáltal, hogy redukálja az OEC Mn-centrumát; emellett az aszkorbát a PSII alternatív elektrondonoraként is viselkedik.
- Aszkorbát hozzáadása nélkül az S-01-es kultúra csak a kénmegvonás negyedik napján, míg a CC-124-es kultúra már a kénmegvonás második napján anaerobbá válik és egy erőteljesebb H<sub>2</sub>-termelés következik be.
- A két, a fotobiológiai H<sub>2</sub>-termelés szempontjából eltérően viselkedő törzs közötti különbség az eltérő hatékonyságú respirációnak és hidrogenáz-aktivitásnak tudható be.
- S-01 törzsben az aszkorbát stimulálja a H<sub>2</sub>-termelést azáltal, hogy megszünteti az OEC-aktivitást és PSII alternatív elektrondonorként a keményítőbontásból jövő elektronokkal együtt hozzájárul a H<sub>2</sub>-termeléshez.
- CC-124 kultúrában az aszkorbátkezelés hatására csökken a termelődött H<sub>2</sub> mennyisége, mivel az aszkorbát kevésbé hatékony PSII donor, mint a vízbontás.

---

## 8. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

### A dolgozat alapját képező közlemények:

Tóth SZ, Puthur JT, Nagy V, Garab G (2009) Experimental evidence for ascorbate-dependent electron transport in leaves with inactive oxygen-evolving complexes. *Plant Physiol.* 149: 1568–1578.  
IF: 6,235

Tóth SZ, Nagy V, Puthur JT, Kovács L, Garab G (2011) The physiological role of ascorbate as photosystem II electron donor: protection against photoinactivation in heat-stressed leaves. *Plant Physiol.* 156: 382–392.  
IF: 6,535

Nagy V, Tengölics R, Schansker G, Rákhely G, Kovács L K, Garab G, Tóth SZ (2012) Stimulatory effect of ascorbate, the alternative electron donor of photosystem II, on the hydrogen production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int. J. Hydrogen Energy* 37: 8864–8871.  
IF: 3,548

Nagy V, Vidal-Meireles A, Tengölics R, Rákhely G, Garab G, Kovács L, Tóth SZ (2015) Ascorbate accumulation during sulphur deprivation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its effects on photosystem II activity and H<sub>2</sub> photoproduction (előkészületben)

## 9. ÖSSZEFOGLALÁS

A növények és cianobaktériumok a fotoszintézis során a napfény energiáját felhasználva szerves anyagokat állítanak elő, amihez a vizet használják fel elektrondonorként és a víz oxidációja során  $O_2$  szabadul fel. A fotoszintézis folyamatát nevezhetjük Földünk egyik legalapvetőbb folyamatának, ugyanis i) a fotoszintetizáló szervezetek  $O_2$  termelése és  $CO_2$  megkötése alapvető szerepet játszott a Föld légkörének kialakulásában és a légkör összetétele egyensúlyának fenntartásában, ii) a szénhidrátok nélkülözhetetlenek majdnem minden életforma számára. Mindemellett a fotoszintézishez kapcsolt  $H_2$ -termelést tartják korunk egyik ígéretes megújuló energiaforrásának.

Az  $O_2$ -termelő élőlények esetében a fotoszintézis folyamata a fényfüggő fotofizikai és fotokémiai folyamatokból és a fénytől független Calvin-Benson ciklusból áll, amelyek – eukarióta szervezetekben – a kloroplasztisban mennek végbe. Minden fotoszintetizáló szervezetben megtalálhatók a tilakoidmembránba ágyazódott vagy ahhoz kapcsolódó, fény abszorpciójára képes klorofill molekulák és különböző kísérőpigmentek (pl. a karotinoidok és fikobilinek). A fotoszintetikus elektrontranszportláncot a fő fehérje komplexek – az első és a második fotokémiai rendszer (PSI és PSII), a citokróm  $b_6f$  komplex, valamint az ATP-szintáz – és a mobilis elemek (plasztokinon, plasztocianin, ferredoxin) alkotják.

A PSII donor oldalán helyezkedik el a vízbontó komplex (OEC), amely a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc egyik legsérülékenyebb komponense, a hő, UV stressz és a donor oldali fotoinhibíció elsődleges célpontja. Utóbbi esetben a PSII reakciócentrumban a  $P680^+$  felhalmozódik, amely oxidatív stresszhez, és végső soron a reakciócentrumok inaktivációjához vezet.

Az aszkorbát a növényi sejtekben mindenütt előforduló multifunkcionális szereppel rendelkező metabolit. Fontos feladata a reaktív oxigén gyökök semlegesítése, de szerepet játszik a redox jelátvitelben, a sejtosztódásban, a sejtfal bioszintézisében, a génexpresszióban, egyes enzimek aktivitásának szabályozásában, valamint a violaxantin-deepoxidáz kofatora. A PhD munkám során az aszkorbát fotoszintetikus elektrontranszport-láncban betöltött szerepét és hidrogéntermelésre gyakorolt hatását vizsgáltam.

Vadtípusú és aszkorbát-hiányos (*vtc2-1*) *Arabidopsis thaliana* növényeken végzett gyors klorofill-a fluoreszcencia mérések alapján megállapítottuk, hogy ha az OEC inaktív az aszkorbát a PSII alternatív elektrondonoraként funkcionál, *in vivo*. Az elektronátadás félideje függ a levelek aszkorbáttartalmától, vadtípusú növényekben 25 ms, míg aszkorbát-hiányos mutánsokban (*vtc2-1*) ez 55 ms volt, ami aszkorbát oldatban történő inkubálás után 32 ms-ra gyorsítható. A termolumineszcencia mérésekből kiderült, hogy az aszkorbát közvetve vagy



közvetlenül a Tyr<sub>Z</sub><sup>+</sup>-hez juttatja az elektronokat. A P<sub>700</sub> oxidációs-redukciós kinetikai mérések azt is megmutatták, hogy az aszkorbát-függő elektrontranszport a PSI-ben is detektálható és 3-(3,4-diklorofenil)-1,1-dimetilureára (DCMU) érzékeny. Ezen eredményeink bizonyítják, hogy az aszkorbát elektronokat juttat a PSII-höz, *in vivo* körülmények között, mérsékelt elektrontranszportot fenntartva.

A vizsgálatok során az oxigénfejlődést általában rövid idejű hőimpulzussal (48-50 °C, 40 s, 9. ábra) teljesen inaktiváljuk, de az aszkorbát-hiányos *A. thaliana* növényeket felhasználva sikerült detektálni enyhébb, élettanilag releváns hőkezelés (39-40 °C, 15 perc) után is az aszkorbát-függő alternatív elektrontranszportot.

Megvizsgáltuk, hogy az aszkorbátnak milyen élettani szerepe lehet egyes stresszhatások, mint pl. a donor oldali fénygátlás kivédésében. Méréseinkhez vad típusú, aszkorbát-hiányos (*vtc2-3*) és aszkorbát-túltermelő (*miox4*) *A. thaliana* növényeket hasonlítottunk össze és vizsgáltuk a PSII reakciócentrumok inaktiválódásának mértékét stressz körülmények között (40°C-on 15 perces hőkezelést követően, 300 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fotonáram-sűrűségű fénykezelés során). Megállapítottuk, hogy hőkezelés, majd az azt követő fénykezelés hatására néhány perc alatt lelassul a Tyr<sub>Z</sub>-P680<sup>+</sup> elektronátadás, majd ezt a PSII reakciócentrumok teljes inaktivációja követi, ami egy jóval lassabb folyamat, kb. 1 óra alatt játszódik le. Western blot analízis alapján megállapítottuk, hogy nem csak a D1 protein, hanem a CP43 belső antenna komplex és a vízbontó komplex 33 kDa-os proteinje is degradálódik ugyanezen idő alatt. Ha aszkorbát-deficiens leveleket 1 mM difenilkarbazidban (DPC, a PSII mesterséges elektrondonora) inkubáljuk, lelassul a PSII reakciócentrum inaktiválódása – megerősítve azt a következtetésünket, hogy az alternatív elektrondonorok jelentős fotoprotektív szerepet töltenek be.

Az aszkorbát H<sub>2</sub>-termelésre gyakorolt hatását *Chlamydomonas reinhardtii* sejteken vizsgáltuk. Ezen egysejtű zöldalga a fotoszintézishez kapcsoltan H<sub>2</sub>-t képes termelni, a PSI akceptor oldalán található Fe-Fe típusú hidrogenáz enzime segítségével. A *C. reinhardtii* hidrogenáz enzime nagyon érzékeny az O<sub>2</sub>-re, jelenlétében a H<sub>2</sub>-termelés gátolt. Ennek kiküszöbölésére Melis és munkatársai (2002) bevezették a kénmegvonás módszerét, amelynek következtében az O<sub>2</sub>-termelésért felelős PSII reakciócentrumok fokozatosan inaktiválódnak.

Az elektronok a hidrogenáz enzimhez három útvonalon keresztül juthatnak el: i) a PSII-függő útvonal – a vízbontásból keletkező elektronok a lineáris elektrontranszporton keresztül jutnak el a hidrogenázhoz; ii) a PSII-független útvonal – a keményítő lebontásából származó elektronok a PQ-poolon keresztül csatlakoznak a lineáris elektrontranszportoz; iii)

a sötétben, anaerob módon történő fermentációs útvonal – a piruvát acetil-Ko-A-vá alakul, miközben a ferredoxin redukálódik, végül az elektronok a hidrogenáz enzimre kerülnek.

Kimutattuk, hogy a magasabb rendű növényekhez hasonlóan *C. reinhardtii* sejtekben is, inaktív OEC mellett az aszkorbát lineáris elektrontranszportot tart fenn. A lehetséges biotechnológiai alkalmazhatóságot abban láttuk, hogy az aszkorbát elektronokat szolgáltat a PSII-n keresztül a hidrogenáz felé, de – a vízbontással ellentétben –  $O_2$  nem képződik.

Normál körülmények között a *C. reinhardtii* aszkorbáttartalma igen kicsi: az alga sejtek kb. 100-szor kevesebb aszkorbátot tartalmaznak, mint a növényi sejtek, azonban oxidatív stressz hatására az aszkorbát mennyisége megnövekedhet. Megfigyeltük, hogy az általunk vizsgált két *C. reinhardtii* (S-01 és CC-124) törzsben a kénmegvonás hatására a sejten belüli aszkorbát-koncentráció jelentősen megemelkedett, illetve a 10 mM külsőleg hozzáadott aszkorbát jelentősen meggyorsította a maximális aszkorbát-koncentráció kialakulását, amely nagyon hasonló volt a kezeletlen kultúrákban mért maximális értékhez. Ebből következik, hogy az általunk külsőleg hozzáadott 10 mM aszkorbát élettanilag releváns, hasonló aszkorbátszint alakul ki a kénmegvonás hatására is. Termolumineszcencia méréseink azt mutatják, hogy az aszkorbát elősegíti a kultúra anaerobbá válását valószínűleg az által, hogy az aszkorbát redukálja az OEC Mn-centrumát; emellett az aszkorbát – átmenetileg – a PSII alternatív elektrondonoraként is viselkedik.

Megfigyeltük, hogy az általunk vizsgált S-01 és CC-124 törzs eltérően viselkedik a fotobiológiai  $H_2$ -termelés szempontjából. A különbség az eltérő hatékonyságú respirációnak és hidrogenáz aktivitásnak tudható be. Gázkromatográfiás mérések mutatják, hogy aszkorbát hozzáadása nélkül az S-01-es kultúra a kénmegvonás negyedik napján, míg a CC-124-es kultúra már a kénmegvonás második napján anaerobbá válik és egy erőteljesebb  $H_2$ -termelés következik be. Az S-01 törzsben az aszkorbát azáltal, hogy megszünteti az OEC aktivitást – feloldja az  $O_2$  gátlást – valamint a PSII alternatív elektrondonorként a keményítőbontásból jövő elektronokkal együtt stimulálja a  $H_2$ -termelést. Ezzel szemben a CC-124 kultúrában az aszkorbátkezelés csökkenti a termelődött  $H_2$  mennyiségét, mivel az aszkorbát kevésbé hatékony PSII donor, mint a vízbontás.

Eredményeink azt mutatják, hogy az aszkorbátnak fontos szabályozó szerepe lehet a fotobiológiai  $H_2$ -termelésben – ami megnyitja annak a lehetőségét, hogy az aszkorbát bioszintézis szabályozása által az OEC és a PSII aktivitása szabályozható, ill. ennek révén a *C. reinhardtii*  $H_2$ -termelésének hatékonysága növelhető.

## 10. SUMMARY

During photosynthesis, via using light energy and water as electron donor, plants and cyanobacteria produce molecular oxygen and organic compounds by reducing CO<sub>2</sub>. Photosynthesis is one of the most important processes on Earth, which i) determines the composition and ensures the stability of the atmosphere and ii) provides organic compounds virtually for the entire biosystem. In addition, photosynthesis-based systems are becoming more and more important as renewable energy sources.

Oxygenic photosynthesis of eukaryotic organisms takes place in the chloroplast, and it consists of photophysical photochemical, processes and light-independent reactions, i.e. the Calvin-Benson cycle. The chloroplasts contain light-absorbing chlorophylls molecules, and other auxiliary pigments bound to protein complexes, which are embedded in the thylakoid membrane. The photosynthetic electron transport is performed by photosystems I and II (PSI and PSII), the cytochrome b<sub>6</sub>f complex, the ATP synthase and several mobile components (plastoquinone, plastocyanin, ferredoxin).

The oxygen-evolving complex (OEC), which is located on the donor side of PSII, is one of the most vulnerable electron transport components and is the primary target of heat stress, UV radiation and donor-side photoinhibition. The donor-side photoinhibition is triggered by the accumulation of P<sub>680</sub><sup>+</sup> and results in the inactivation of PSII.

Ascorbate is a metabolite with multifunctional roles in plants and can be found in all cell compartments. It plays roles in the elimination of reactive oxygen species, redox signalling, cell division, cell wall biosynthesis, regulation of gene expression and activity of certain enzymes. It also serves as a cofactor for violaxanthin deepoxidase. In my PhD work I studied the role of ascorbate in the photosynthetic electron transport chain and its effect on the H<sub>2</sub> production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.

Based on fast fluorescence transient measurements performed on wide-type and ascorbate-deficient (*vtc2-1*) *Arabidopsis thaliana* leaves we concluded that if the OEC is inactivated, ascorbate can function as an alternative electron donor to PSII, *in vivo*. The rate of electron transfer to PSII depends on the ascorbate content of the leaves. The half-time of electron donation is approx. 25 ms in wide-type and 55 ms in ascorbate-deficient (*vtc2-1*) mutant plants. The rate of electron donation can be increased up to 32 ms upon incubation of detached leaves in ascorbate solution. Thermoluminescence measurements revealed that ascorbate donates electrons to PSII via Tyr<sub>Z</sub><sup>+</sup> either directly or indirectly. The ascorbate-dependent electron transport is also manifested in the 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU)-sensitive re-reduction kinetics of P<sub>700</sub>. These observations prove that

ascorbate donates electrons to PSII *in vivo* and is capable to maintain a continuous electron transport.

In order to completely inactivate the OEC we applied a short heat pulse (48-50 °C, 40 s), but we could detect ascorbate-dependent electron transport after moderate (39-40 °C, 15 min), physiologically relevant heat treatments as well.

We have investigated the possible role of ascorbate in the protection against donor-side induced photoinhibition. Wild-type, ascorbate-deficient (*vtc2-3*) and ascorbate-overproducing (*miox4*) *A. thaliana* plants were exposed to 15 min 40 °C heat treatment followed by illumination at a photon flux density of 300  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and the extents of PSII inactivation were compared. We have shown that under these stress conditions the Tyr<sub>Z</sub>-P<sub>680</sub><sup>+</sup> electron transfer is decelerated in a few minutes, which is followed by the complete inactivation of PSII (approx. in one hour). Western blot analysis demonstrated that along with the D1 protein, the inner antenna protein complex of PSII, CP43 and the PsbO protein of OEC were also degraded at the same rate. When *vtc2* leaves were incubated in the presence of diphenylcarbazide (DPC), an artificial PSII donor, the inactivation of PSII reaction centres was retarded, corroborating our conclusion that alternative electron donors of PSII play important role in photoprotection.

We have also studied the involvement of ascorbate-dependent electron transport in the H<sub>2</sub> production of *C. reinhardtii*. This unicellular green alga is capable to produce H<sub>2</sub> linked to the photosynthetic electron transport by the aid of its Fe-Fe type hydrogenase enzyme located on the PSI acceptor side. This hydrogenase enzyme is very sensitive to O<sub>2</sub>. To avoid the inhibitory effect of O<sub>2</sub>, Melis et al. (2002) developed a method based on sulphur deprivation that results in a gradual inactivation of PSII reaction centres.

In *Chlamydomonas* cells, the electrons arrive to the hydrogenase via three different pathways: i) a PSII-dependent pathway, which directly links water-splitting activity to H<sub>2</sub> evolution via the linear electron transport; ii) a PSII-independent pathway, where electrons derived from starch breakdown are transferred to the Fe-Fe hydrogenase via the PQ pool and the PSI-mediated electron flow; iii) a dark fermentative pathway, where pyruvate is converted into acetyl-CoA by a pyruvate ferredoxin oxidoreductase (PFR) resulting in a reduced ferredoxin which, in the absence of light, may act as an electron donor to hydrogenase.

We have demonstrated that in *C. reinhardtii*, similarly to higher plants, ascorbate can support a linear electron transport in the absence of active OEC. The fact that ascorbate can maintain electron transport without O<sub>2</sub> production raised the possibility of a potential biotechnological application.

Under normal physiological conditions the ascorbate content of *C. reinhardtii* cells is approx. 100 times lower than in plant cells – although it strongly increases under oxidative stress conditions. We have observed that upon sulphur deprivation the ascorbate content of the two algal cell lines examined (CC-124 and S-01) has dramatically increased. Furthermore, addition of exogenous ascorbate at a concentration of 10 mM during sulphur deprivation accelerated the rise of ascorbate content to its maximum, which was as high as in the absence of exogenous ascorbate, indicating that the ascorbate treatment we applied is physiologically relevant. Thermoluminescence measurements revealed that in addition to the role of ascorbate as an alternative electron donor, it also facilitates the development of anaerobiosis in the culture, most probably via the reduction of Mn-complex of OEC.

The yields of photobiological H<sub>2</sub> production are different in the two examined *C. reinhardtii* cell lines, which may be explained by their different hydrogenase and respiration activities. Gas chromatography measurements have shown that in the absence of exogenous ascorbate the CC124 and S-01 cultures became anaerobic in 2 and 4 days, respectively, after the initiation of sulphur deprivation. Sulphur deprivation induced a more efficient H<sub>2</sub> production in CC124 than in S-01. The addition of ascorbate during sulphur deprivation stimulates the H<sub>2</sub> production in S-01 by suppressing the OEC activity and eliminating the inhibitory effect of O<sub>2</sub> and by donating electrons to PSII. In contrast, in CC124 cultures ascorbate decreases the yield of H<sub>2</sub> production, because ascorbate is a less efficient electron donor than water splitting.

Our results show that ascorbate may have an important regulatory effect on photobiological H<sub>2</sub> production; this raises the possibility of enhancing the H<sub>2</sub> production by regulating the activity of OEC and PSII via modulating the ascorbate biosynthetic pathways in *C. reinhardtii*.

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először is köszönetet szeretnék mondani lelkiismeretes, precíz, segítőkész témavezetőimnek Dr. Tóth Szilvia Zitának és Dr. Garab Győzőnek, akik tanácsaikkal és útmutatásukkal eredményessé tették munkámat.

Külön köszönet illeti Dr. Kovács Lászlót, akitől rengeteg segítséget, szakmai tudást és bátorítást kaptam a munkám során, akihez mindig bizalommal fordulhattam bármilyen kérdéssel.

Köszönettel tartozom André Vidal-Meirelesnek a kísérletekben nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért.

Köszönöm Dr. Zsíros Ottónak, Dr. Gombos Zoltánnak és Rédei Ágnesnek a segítségüket és hasznos tanácsaikat, amellyel megkönnyítették munkámat, illetve minden kedves munkatársamnak, aki valamilyen módon hozzájárult munkám sikerességéhez.

Köszönöm továbbá Dr. Rákhely Gábornak és Prof. Kovács L. Kornélnak a Szegedi Tudományegyetem Biotechnológia Tanszék vezetőinek, hogy lehetővé tették a gázkromatográfiás méréseket és Dr. Tengölics Rolandnak az ebben nyújtott segítséget.

Hálás szívvel köszönöm nagyszüleimnek és szüleimnek, hogy lehetővé tették számomra, hogy a Szegedi Tudományegyetemen tanulhattam, nővéremnek, Nagy Ágotának, és Lukács Zoltánnak, hogy mindvégig mellettem álltak és számíthattam rájuk. Köszönöm barátaimnak a biztatást, hogy tartották bennem a lelket és végig hittek bennem.

## 12. IRODALOMJEGYZÉK

- Abrego D, Ulstrup KE, Willis BL, van Oppen MJH (2008) Species-specific interactions between algal endosymbionts and coral hosts define their bleaching response to heat and light stress. *Proc. Biol. Sci.* 275: 2273–2282.
- Allakhverdiev SI, Kreslavski VD, Klimov VV, Los DA, Carpentier R, Mohanty P (2008) Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynth. Res.* 98: 541–550.
- Allahverdiyeva Y, Suorsa M, Rossi F, Pavesi A, Kater MM, Antonacci A, L Tadini, Mathias Pribil, Schneider A, Wanner G, Leister D, Aro EM, Barbato R, Pesaresi P (2013) *Arabidopsis* plants lacking PsbQ and PsbR subunits of the oxygen-evolving complex show altered PSII super-complex organization and short-term adaptive mechanisms. *Plant J.* 75: 671–684.
- Allen JF, de Paula WBM, Puthiyaveetil S, Nield J (2011) A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 16: 645–655.
- Amunts A, Toporik H, Borovikova A, Nelson N (2010) Structure determination and improved model of plant photosystem I. *J. Biol.Chem.* 285: 3478–3486.
- Andersson B, Anderson JM (1980) Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 593: 427–440.
- Antal TK, Krendeleva TE, Laurinavichene, Makarova VV, Ghirardi ML, Rubin AB, Tsygankov AA, Seibert M (2003) The dependence of algal H<sub>2</sub> production on photosystem II and O<sub>2</sub> consumption activities in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cell. *Biochim. Biophys. Acta* 1607: 153–160.
- Antal TK, Krendeleva TE, Pashchenko VZ, Rubin AB, Stensjo K, Tyystjärvi E, et al. (2012) Photosynthetic hydrogen production: mechanisms and approaches. In: Azbar N, Levin D, editor. *State of the art and progress of biohydrogen*. Bentham Science Publishers, Canada. pp. 25–53.
- Aro E-M, Virgin I, Andersson B (1993) Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* 1143: 113–134.
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141: 391–396.
- Austin JR, Staehelin LA (2011) Three-dimensional architecture of grana and stroma thylakoids of higher plants as determined by electron tomography. *Plant Physiol.* 155: 1601–1611.
- Babcock GT, Blankenship RE, Sauer K (1976) Reaction kinetics for positive charge accumulation on the water side of chloroplast photosystem II. *FEBS Lett* 61: 286–289.
- Bamberger ES, King D, Erbes DL, Gibbs M (1982) H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> evolution by anaerobically adapted *Chlamydomonas reinhardtii* F60. *Plant Physiol.* 69: 1268–1273.
- Baniulis D, Yamashita E, Zhang H, Hasan SS, Cramer WA (2008) Structure-function of the cytochrome b<sub>6</sub>f complex. *Photochem. Photobiol.* 84: 1349–1358.
- Barber J (2003) Photosystem II: the engine of life. *Quarterly Reviews of Biophysics* 36: 71–89.
- Barber J (2008) Structure of the oxygen-evolving complex of photosystem II. *Inorg. Chem.* 47: 1700–1710.
- Barra M, Haumann M, Dau H (2005) Specific loss of the extrinsic 18 kDa protein from photosystem II upon heating to 47°C causes inactivation of oxygen evolution likely due to Ca release from the Mn-complex. *Photosynth. Res.* 84: 231–237.
- Barta C, Kalai T, Hideg K, Vass I, Hideg É (2004) Differences in the ROS-generating efficacy of various ultraviolet wavelengths in detached spinach leaves. *Funct. Plant Biol.* 31: 23–28.

- Barta C, Dunkle AM, Wachter RM, Salvucci ME (2010) Structural changes associated with the acute thermal instability of Rubisco activase. *Arch. Biochem. Biophys.* 499: 17–25
- Bassi R, Machold O, Simpson D (1985) Chlorophyll-proteins of two photosystem I preparations from maize. *Carlsberg Res. Commun.* 50: 145–162.
- Ben-Shem A, Frolov F, Nelson N (2003) Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* 426: 630–635.
- Blankenship RE (1992) Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynth. Res.* 33: 91–111.
- Blankenship RE (2001) Molecular evidence for the evolution of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 6: 4–6.
- Blubaugh DJ, Cheniae GM (1990) Kinetics of photoinhibition in hydroxylamine-extracted photosystem II membranes: relevance to photoactivation and sites of electron donation. *Biochemistry* 29: 5109–5118.
- Blubaugh DJ, Atamian M, Babcock GT, Golbeck JH, Cheniae GM (1991) Photoinhibition of hydroxylamine-extracted photosystem II membranes: identification of the sites of photodamage. *Biochemistry* 30: 7586–7597.
- Böttcher B, Gräber P (2008) The structure of the H<sup>+</sup>-ATP synthase from chloroplasts. Fromme P (editor), photosynthetic protein complexes, 201–216, Weinheim, Wiley Blackwell.
- Boyer PD (1993) The binding change mechanism for ATP synthase - Some probabilities and possibilities. *Biochim. Biophys. Acta* 1140: 215–250.
- Boyer PD (1998) ATP synthase - past and future. *Biochim. Biophys. Acta* 1365: 3–9.
- Bricker TM, Frankel LK (2011) Auxiliary functions of the PsbO, PsbP and PsbQ proteins of higher plant Photosystem II: A critical analysis. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* 104: 165–178.
- Burghardt M, Burghardt A, Gall J, Rosenberger C, Riederer M (2008) Ecophysiological adaptations of water relations of *Teucrium chamaedrys* L. to the hot and dry climate of xeric limestone sites in Franconia (Southern Germany). *Flora* 203: 3–13.
- Büchel C, Garab G (1995) Electrochromic absorbance changes in the chlorophyll-c-containing alga *Pleurochloris meiringensis* (*Xanthophyceae*). *Photosynth. Res.* 43: 49–56.
- Caffarri S, Kouřil R, Kereiche S, Boekema EJ, Croce R (2009) Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *EMBO J.* 28: 3052–3063.
- Caffarri S, Tibiletti T, Jennings RC and Santabarbara S (2014) A comparison between plant photosystem I and photosystem II architecture and functioning. *Curr. Protein Pept. Sci.* 15: 296–331.
- Callahan FE, Cheniae GM (1985) Studies on the photoactivation of the water-oxidizing enzyme. I. Processes limiting photoactivation in hydroxylamine-extracted leaf segments. *Plant Physiol.* 79: 777–786.
- Callahan FE, Becker DW, Cheniae GM (1986) Studies on the photoactivation of the water-oxidizing enzyme. II. Characterization of weak light photoinhibition of PSII and its light-induced recovery. *Plant Physiol.* 82: 261–269.
- Capaldi RA, Aggeler R (2002) Mechanism of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends Plant Sci.* 27: 154–160.
- Castillo FJ, Greppin H (1988) Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum alba* L. leaves after ozone exposure. *Environ. Exp. Bot.* 28: 231–238.
- Chen GX, Blubaugh DJ, Homann PH, Golbeck JH, Cheniae GM (1995) Superoxide contributes to the rapid inactivation of specific secondary donors of the photosystem II reaction center during photodamage of manganese-depleted photosystem II membranes. *Biochemistry* 34: 2317–2332.



- Chochois V, Dauvillée D, Beyly A, Tolleter D, Cuiné S, Timpano H, Ball S, Cournac L és Peltier G (2009) Hydrogen production in *Chlamydomonas*: Photosystem II-dependent and -independent pathways differ in their requirement for starch metabolism. *Plant Physiol.* 151: 631–640.
- Chylla RA, Garab G, Whitmarsh J (1987) Evidence for slow turnover in a fraction of photosystem II complexes in thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 894: 562–571.
- Colville L, Smirnoff N (2008) Antioxidant status, peroxidase activity, and PR protein transcript levels in ascorbate-deficient *Arabidopsis thaliana* vtc mutants. *J. Exp. Bot.* 59: 3857–3868.
- Conklin PL, Williams EH, Last RL (1996) Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 9970–9974.
- Conklin PL, Saracco SA, Norris SR, Last RL (2000) Identification of ascorbic acid-deficient *Arabidopsis thaliana* mutants. *Genetics* 154: 847–856.
- Craigie RA, Cavalier-Smith T (1982) Cell volume and the control of the *Chlamydomonas* cell cycle. *J. Cell Set.* 54: 173–191.
- Cramer WA, Zhang H, Yan J, Kurisu G, Smith JL (2006) Transmembrane traffic in the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 769–790.
- Croce R, Canino G, Ros F, Bassi R (2002) Chromophore organization in the higher-plant photosystem II antenna protein CP26. *Biochemistry-US* 41: 7334–7343.
- Croce R, van Amerongen H (2013) Light-harvesting in photosystem I. *Photosynth. Res.* 116: 153–166.
- Crofts AR (2004) The cytochrome bc<sub>1</sub> complex: Function in the context of structure. *Annu. Rev. Physiol.* 66: 689–733.
- Dau H, Zaharieva I, Haumann M (2012) Recent developments in research on water oxidation by photosystem II. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 16: 3–10.
- De Las Rivas J, Barber J (1997) Structure and thermal stability of photosystem II reaction centers studied by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 36: 8897–8903.
- Dekker JP, Boekema EJ (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1706: 12–39.
- Demmig-Adams B, Gilmore AM and Adams WW (1996) *In vivo* functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* 10: 403–412.
- Demming, B, Björkman (1987) Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77K) and photon yield of O<sub>2</sub> evolution in levels of higher plants. *Planta* 171: 171–184.
- de Ronde JA, Cress WA, Krüger GHJ, Strasser RJ, van Staden J (2004) Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. *J. Plant Physiol.* 161: 1211–1224.
- Desikan R, Mackerness SA-H, Hancock JT, Neill SJ (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* 127: 159–172.
- De Tullio MC, Paciolla C, Vecchia FD, Rascio N, D'Emerico S, De Gara L, Liso R, Arrigoni O (1999) Changes in onion root development induced by the inhibition of peptidyl-prolyl hydroxylase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. *Planta* 209: 424–434.
- Dowdle J, Ishikawa T, Gatzek S, Rolinski S, N Smirnoff (2007) Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant J.* 52: 673–689.
- Drop B, Webber-Birungi M, Fusetti F, Kouřil R, Redding KE, Boekema EJ, Croce R (2011) Photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii* contains nine light-harvesting complexes (Lhca) located on one side of the core. *J. Biol. Chem.* 286: 44878–44887.

- Drop B, Webber-Birungi M, Yadav SKN, Filipowicz-Szymanska A, Fusetti F, Boekema EJ, Croce R (2014) Light-harvesting complex II (LHCII) and its supramolecular organization in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1837: 63–72.
- Ducruet JM, Lemoine Y (1985) Increased heat sensitivity of the photosynthetic apparatus in triazine-resistant biotypes from different plant species. *Plant Cell Physiol.* 26: 419–429.
- Ducruet JM, Vass I (2009) Thermoluminescence: experimental. *Photosynth. Res.* 101: 195–204.
- Ducruet JM (2013) Pitfalls, artefacts and open questions in chlorophyll thermoluminescence of leaves or algal cells. *Photosynth. Res.* 115: 89–99.
- Elrad D, Grossman AR (2004) A genome's-eye view of the light-harvesting polypeptides of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.* 45: 61–75.
- Enami I, Kitamura M, Tomo T, Isokawa Y, Ohta H, Katoh S (1994) Is the primary cause of thermal inactivation of oxygen evolution in spinach PSII membranes release of the extrinsic 33 kDa protein or of Mn? *Biochim. Biophys. Acta* 1186: 52–58.
- Eskling M, Åkerlund H-E (1998) Changes in the quantities of violaxanthin de-epoxidase, xanthophylls and ascorbate in spinach upon shift from low to high light. *Photosynth. Res.* 57: 41–50.
- Esser L, Elberry M, Zhou F, Yu CA, Yu L, Xia D (2008) Inhibitor-complexed structures of the cytochrome bc<sub>1</sub> from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Biol. Chem.* 283: 2846–2857.
- Florin L, Tsokoglou A, Happe T (2001) A novel type of Fe-hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 276: 6125–6132.
- Forestier M, King P, Zhang L, Posewitz M, Schwarzer S, Happe T, Ghirardi ML, Seibert M (2003) Expression of two [Fe]-hydrogenases in *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic conditions. *Eur. J. Biochem.* 270: 2750–2758.
- Fromme P, Graber P, Salnikow J (1987) Isolation and identification of 4th subunit in the membrane part of chloroplast ATP-synthase. *FEBS Letters* 218: 27–30.
- Fromme P, Jordan P, Krauss N (2001) Structure of photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* 1507: 5–31.
- Fouchard S, Hemschemeier A, Caruana A, Pruvost J, Legrand J, Happe T, Peltier G, Cournac L (2005) Autotrophic and mixotrophic hydrogen photoproduction in sulfur-deprived *Chlamydomonas* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6199–6205.
- Foyer CH, Lelandais MA (1996) A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasmalemma membranes of pea leaf mesophyll cells. *J. Plant Physiol.* 148: 391–398.
- Fufezan C, Gross CM, Sjödin M, William Rutherford A, Krieger-Liszkay A, Kirilovsky D (2007) Influence of the redox potential of the primary quinone electron acceptor on photoinhibition in photosystem II. *J. Biol. Chem.* 282: 12492–12502.
- Genty B, Briantais J-M, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87–92.
- Gest N, Gautier H, Stevens R (2012) Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *J. Exp. Bot.* 64: 33–53.
- Gfeller RP, Gibbs M. (1984). Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*: I. analysis of fermentative products from starch in dark and light. *Plant Physiol.* 75: 212–18.
- Ghirardi ML, Zhang L, Lee JW, Flynn T, Seibert M, Greenbaum E és Melis A (2000) Microalgae: a green source of renewable H<sub>2</sub>. *Trends Biotechnol.* 18: 506–511.

- Ghirardi ML, Kosourov S, Tsygankov A, Seibert M (2000). Two-phase photo-biological algal H<sub>2</sub>-production system. In: Proceedings of the 2000 DOE Hydrogen Program Review: 9–11.
- Giacomelli L, Rudella A, van Wijk KJ (2006) High light response of the thylakoid proteome in *Arabidopsis* wild type and the ascorbate-deficient mutant *vtc2-2*: a comparative proteomics study. *Plant Physiol.* 141: 685–701.
- Gorman DS, Levine RP (1965) Cytochrome f and plastocyanin: Their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 1665–1669.
- Govindjee (2004) Chlorophyll *a* fluorescence: a bit of basics and history. In GC Papageorgiou, Govindjee, eds, *Chlorophyll a fluorescence: A signature of photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration*, Vol 19. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 1–42.
- Grace SC, Logan BA (1996) Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species. *Plant Physiol.* 112: 1631–1640.
- Greenbaum E, Guillard RRL, Sunda WG (1983) Hydrogen and oxygen photoproduction by marine algae. *Photochem. Photobiol.* 37: 649–655.
- Happe T, Naber JD (1993) Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* 214: 475–481.
- Happe T, Mosler B, Naber JD (1994) Induction, localization and metal content of hydrogenase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* 222: 769–774.
- Happe T, Kaminski A. (2002) Differential regulation of the Fehydrogenase during anaerobic adaptation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem* 269: 1022–1032.
- Harris EH (1989) The *Chlamydomonas* Sourcebook, p. 780, Academic Press, San Diego, CA
- Harris EH (2001) *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 363–406.
- Hauska G in: A. Trebst, M. Avron (Eds.), *Encyclopedia of plant physiology. New Series*, Vol. 5 Springer Verlag, Berlin (1977), pp. 253–265 Photosynthesis I.
- Havaux M (1993) Characterization of thermal damage to the photosynthetic electron transport system in potato leaves. *Plant Sci.* 94: 19–33.
- Hertle AP, Blunder T, Wunder T, Pesaresi P, Pribil M, Armbruster U, Leister D (2013) PGRL1 is the elusive ferredoxin-plastoquinone reductase in photosynthetic cyclic electron flow. *Molecular Cell* 49: 511–523.
- Hideg É, Vass I (1996) UV-B induced free radical production in plant leaves and isolated thylakoid membranes. *Plant Sci.* 115: 251–260.
- Horemans N, Foyer CH, Potters G, Asard H (2000) Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 531–540.
- Huang D, Everly RM, Cheng RH, Heymann JB, Schagger H, Sled V, Ohnishi T, Baker TS and Cramer WA (1994) Characterization of the chloroplast cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex as a structural and functional dimer. *Biochemistry* 33: 4401–4409.
- Hutner SH, Provasoli L, Schatz A, Haskins CP (1950) Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proc. Am. Philos. Soc.* 94: 152–170.
- Ivanov B, Edwards G (2000) Influence of ascorbate and the Mehler peroxidase reaction on non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in maize chloroplasts. *Planta* 210: 765–774.
- Ivanov BN, Sacksteder CA, Kramer DM, Edwards GE (2001) Light-induced ascorbate-dependent electron transport and membrane energization in chloroplasts of bundle sheath cells of the C<sub>4</sub> plant maize. *Arch. Biochem. Biophys.* 385: 145–153.

- Jander G, Norris SR, Rounsley SD, Bush DF, Levin IM, Last RL (2002) *Arabidopsis* map-based cloning in the post-genome era. *Plant Physiol.* 129: 440–450.
- Jegerschöld C, Styring S (1996) Spectroscopic characterization of intermediate steps involved in donor-side-induced photoinhibition of photosystem II. *Biochemistry* 35: 7794–7801.
- Jensen PE, Bassi R, Boekema EJ, Dekker JP, Jansson S, Leister D, Robinson C, Scheller HV (2007) Structure, function and regulation of plant Photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 335–352.
- Johanningmeier U, Heiss S (1993) Construction of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant with an intronless *psbA* gene. *Plant. Mol. Biol.* 22: 91–99.
- Johnson GN (2011) Reprint of: physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1807: 906–911.
- Junge W, Lill H, Engelbrecht S (1997) ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics. *Trends Plant Sci.* 22: 420–423.
- Junge W (2004) Protons, proteins and ATP. *Photosynth. Res.* 80: 197–221.
- Katoh S, San Pietro A (1967) Ascorbate-supported NADP<sup>+</sup> photoreduction by heated *Euglena* chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 122: 144–152.
- Kessler E (1974) Hydrogenase, photoreduction and anaerobic growth. In WDP Stewart, eds, *Algal Physiology and Biochemistry*. Blackwell, Oxford, pp 456–473.
- Kitajima M, Butler WL (1975) Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim. Biophys. Acta* 376: 105–115.
- Kiyota M, Numayama N, Goto K (2006) Circadian rhythms of the L-ascorbic acid level in *Euglena* and spinach. *J. Photochem. Photobiol. B* 84: 197–203.
- Kok B, Forbush B, McGloin M (1970) Cooperation of charges in photosynthetic oxygen evolution. A linear four step mechanism. *Photochem. Photobiol.* 11: 457–475.
- Kosourov S, Tsygankov A, Seibert M, Ghirardi ML (2002) Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of culture parameters. *Biotechnol. Bioeng.* 78: 731–740.
- Kosourov SN, Seibert M (2009) Hydrogen photoproduction by nutrient-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells immobilized within thin alginate films under aerobic and anaerobic conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 102: 50–58.
- Kouřil R, Oostergetel GT, Boekema EJ (2011) Fine structure of granal thylakoid membrane organization using cryo electron tomography. *Biochim. Biophys. Acta* 1807: 368–374.
- Kouřil R, Wientjes E, Bultema JB, Croce R, Boekema EJ (2012) High-light vs. low-light: effect of light acclimation on photosystem II composition and organization in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta* 1827: 411–419.
- Krause GH (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 313–49.
- Kroth P, Strotmann H (1999) Diatom plastids: Secondary endocytobiosis, plastid genome and protein import. *Physiol. Plant.* 107: 136–141.
- Kurisu G, Zhang HM, Smith JL, Cramer WA (2003) Structure of the cytochrome b<sub>6</sub>f complex of oxygenic photosynthesis: Tuning the cavity. *Science* 302: 1009–14.
- LaingWA, Wright MA, Cooney J, Bulley SM (2007) The missing step of the L-galactose pathway of ascorbate biosynthesis in plants, an L-galactose guanyltransferase, increases leaf ascorbate content. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 9534–9539.
- Lam E, Ortiz W, Malkin R (1984) Chlorophyll a/b proteins of photosystem I. *FEBS Lett* 168: 10–14.
- Lazár D (2006) The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Funct. Plant Biol.* 33: 9–30.

- Lennon AM, Prommeeenate P, Nixon PJ (2003) Location, expression and orientation of the putative chlororespiratory enzymes, Ndh and IMMUTANS, in higher-plant plastids. *Planta* 218: 254–260.
- Linster CL, Clarke SG (2008) L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of *VTC2*. *Trends Plant Sci.* 13: 567–573.
- Liu Z, Yan H, Wang K, Kuang T, Zhang J, Gui L, An X, Chang W (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* 428: 287–292.
- Locato V, Cimini S, De Gara L (2013) Strategies to increase vitamin C in plants: from plant defense perspective to food biofortification. *Front. Plant Sci.* 152: 1–12.
- Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL (2004) Myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiol.* 134: 1200–1205.
- Mackerness S A-H (2000) Plant responses to ultraviolet-B (UV-B: 280–320 nm) stress: What are the key regulators? *Plant Growth Regul.* 32: 27–39.
- Makarova VV, Kosourov S, Krendeleva TE, Semin BK, Kukarskikh GP, Rubin AB, Sayre RT, Ghirardi ML, Seibert M (2007) Photoproduction of hydrogen by sulfur-deprived *C. reinhardtii* mutants with impaired photosystem II photochemical activity. *Photosynth. Res.* 94: 79–89.
- Mano J, Ushimaru T, Asada K (1997) Ascorbate in thylakoid lumen as an endogenous electron donor to photosystem II: protection of thylakoids from photoinhibition and regeneration of ascorbate in stroma by dehydroascorbate reductase. *Photosynth. Res.* 53: 197–204.
- Mano J, Hideg É, Asada K (2004) Ascorbate in thylakoid lumen functions as an alternative electron donor to photosystem II and photosystem I. *Arch. Biochem. Biophys.* 429: 71–80.
- Marín-Navarro J, Esquivel MG, Moreno J (2010) Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii* revisited: Rubisco as a biotechnological target. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 1785–1793.
- Markov SA, Eivazova ER, Greenwood J (2006) Photostimulation of H<sub>2</sub> production in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* upon photoinhibition of its O<sub>2</sub>-evolving system. *Int. J. of Energy* 31: 1314–1317.
- Maslenkova L, Zeinalov Y (1999) Thermoluminescence and oxygen evolution in ja-treated barley (*Hordeum vulgare* L.). *Bilg. J. Plant Physiol.* 25: 58–64.
- McEvoy JP, Brudvig GW (2006) Water-splitting chemistry of photosystem II. *Chemical Reviews* 106: 4468–4483.
- McFadden GI, van Dooren GG (2004) Evolution: red algal genome affirms a dispatch common origin of all plastids. *Current Biology* 14: 514–516.
- Melis A, Zhang LP, Forestier M, Ghirardi ML, Seibert M. (2000) Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 122: 127–135.
- Melis A, Happe T (2001) Hydrogen production. Green algae as a source of energy. *Plant Physiol.* 127: 740–748.
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A....Team JA (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318: 245–251.
- Millar AH, Mittova V, Kiddle G, Heazlewood JL, Bartoli CG, Theodoulou FL, Foyer CH (2003) Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiol.* 133: 443–447.
- Minagawa J, Takahashi Y (2004) Structure, function and assembly of Photosystem II and its light-harvesting proteins. *Photosynth. Res.* 82: 241–263.
- Minagawa J (2013) Dynamic reorganization of photosynthetic supercomplexes during environmental acclimation of photosynthesis. *Front. Plant Sci.* 513: 1–11.

- Miyake C, Miyata M, Shinzaki Y, Tomizawa K (2005) CO<sub>2</sub> response of cyclic electron flow around PSI (CEF-PSI) in tobacco leaves - relative electron fluxes through PSI and PSII determine the magnitude of non-photochemical quenching (NPQ) of chl fluorescence. *Plant Cell Physiol.* 46(4): 629–637.
- Mohanty N, Yamamoto HY (1995) Mechanism of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching. I. The role of de-epoxidised xanthophylls and sequestered thylakoid membrane protons as probed by dibucaine. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 231–38.
- Moroney JV, Lopresti L, McEwen BF, McCarty RE and Hammes GG (1983) The Mr-value of chloroplast coupling factor 1. *FEBS Letters* 158: 58–62.
- Morosinotto T, Caffarri S, Dall'Osto L, Bassi R (2003) Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids. *Physiol. Plant.* 119: 347–354.
- Mulder DW, Shepard EM, Meuser JE, Joshi N, King PW, Posewitz MC, Broderick JB, Peters JW (2011) Insights into [FeFe]-hydrogenase structure, mechanism, and maturation. *Structure* 19: 1038–52.
- Mullineaux CW (2005) Function and evolution of grana. *Trends Plant Sci.* 10: 521–525.
- Munekage Y, Hashimoto M, Miyake C, Tomizawa K-I, Endo T, Tasaka M és Shikanai T (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* 429: 579–582.
- Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev SI (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 414–421.
- Mustárdy L, Garab G (2003) Granum revisited. A three-dimensional model - where things fall into place. *Trends Plant Sci.* 8: 117–122.
- Mustárdy L, Buttle K, Steinbach G, Garab G (2008) The three-dimensional network of the thylakoid membranes in plants: quasi-helical model of the granum-stroma assembly. *Plant Cell* 20: 2552–2557.
- Müller-Moulé P, Conklin PL, Niyogi KK (2002) Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity *in vivo*. *Plant Physiol.* 128: 970–977.
- Müller-Moulé P, Havaux M, Niyogi KK (2003) Zeaxanthin deficiency enhances the high light sensitivity of an ascorbate-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133: 748–760.
- Müller-Moulé P, Golan T, Niyogi KK (2004) Ascorbate-deficient mutants of *Arabidopsis* grow in high light despite chronic photooxidative stress. *Plant Physiol.* 134: 1163–1172.
- Nadtochenko VA, Shelaev IV, Mamedov MD, Shkuropatov AYa, Semenov AYU, Shuvalov VA (2014) Primary radical ion pairs in photosystem II core complexes. *Biochem.-Moscow* 79: 197–204.
- Nagy V, Tengölics R, Schansker G, Rákhely G, Kovács LK, Garab G, Tóth SZ (2012) Stimulatory effect of ascorbate, the alternative electron donor of photosystem II, on the hydrogen production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int. J. of Hydrogen Energy* 37: 8864–8871.
- Nagy V, Tengölics R, Schansker G, Rákhely G, Kovács LK, Garab G, Tóth SZ (2015) Corrigendum to “Stimulatory effect of ascorbate, the alternative electron donor of photosystem II, on the hydrogen production of sulphur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*” [*Int J Hydrogen Energy* 37 (2012) 8864–8871]. *Int J Hydrogen Energy* 40: 1267.
- Nash D, Miyao M, Murata N (1985) Heat inactivation of oxygen evolution in photosystem II particles and its acceleration by chloride depletion and exogenous manganese. *Biochim. Biophys. Acta* 807: 127–133.
- Nelson N, Nelson H and Racker E. (1972) Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. XII. Purification and properties of an inhibitor isolated from chloroplast coupling factor 1. *J. Biol. Chem.* 247: 6506–6510.



- Nelson N, Ben-Shem A (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 971–982.
- Nelson N, Yocum CF (2006) Structure and Function of Photosystems I and II. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 521–565.
- Neubauer C, Schreiber U (1987) The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination. I. Saturation characteristics and partial control by the photosystem II acceptor side. *Z Naturforsch* 42c: 1246–1254.
- Nevo R, Charuvi D, Tsabari O, Reich Z (2012) Composition, architecture and dynamics of the photosynthetic apparatus in higher plants. *Plant J.* 70: 157–176.
- Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Murata N (2006) A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 742–749.
- Niyogi KK (1999) Photoprotection revisited: Genetic and Molecular Approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 333–3359.
- Noth J, Krawietz D, Hemschemeier A, Happe T (2012). Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase is coupled to light-independent hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 288: 4368–77.
- Pagliano C, Saracco G, Barber J (2013) Structural, functional and auxiliary proteins of photosystem II. *Photosynth. Res.* 116: 167–188.
- Pan RL, Izawa S (1979) Photosystem II energy coupling in chloroplasts with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as electron donor. *Biochim. Biophys. Acta* 547: 311–319.
- Pan X, Li M, Wan T, Wang L, Jia C, Hou Z, Zhao X, Zhang J, Chang W (2011) Structural insights into energy regulation of lightharvesting complex CP29 from spinach. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18: 309–315.
- Passarini F, Wientjes E, Hienerwadel R, Croce R (2009) Molecular basis of light harvesting and photoprotection in CP24 unique features of the most recent antenna complex. *J. Biol. Chem.* 284: 29536–29546.
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedeman PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls-*a* and -*b* with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975: 384–394.
- Porra RJ (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. *Photosynth. Res.* 73: 149–156.
- Pospíšil P, Tyystjärvi E (1999) Molecular mechanism of high-temperature-induced inhibition of acceptor side of photosystem II. *Photosynth. Res.* 62: 55–66.
- Pick U, Racker E (1979) Purification and reconstitution of the N, N'-dicyclohexylcarbodiimide-sensitive ATPase complex from spinach chloroplast. *J. Biol. Chem.* 254: 2793–2799.
- Pierre Y, Breyton C, Lemoine Y, Robert B, Vernottei C, Popot JL (1997) On the Presence and Role of a Molecule of chlorophyll *a* in the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex. *J. Biol. Chem.* 272: 21901–21908.
- Popelkova H, Yocum CF (2011) PsbO, the manganese-stabilizing protein: Analysis of the structure–function relations that provide insights into its role in photosystem II. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* 104: 179–190.
- Posewitz MC, Smolinski SL, Kanakagiri S, Melis A, Seibert M, Ghirardi ML (2004) Hydrogen photoproduction is attenuated by disruption of an isoamylase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 16: 2151–2163.
- Potters G, De Gara L, Asard H, Horemans N (2002) Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol. Biochem.* 40: 537–548.
- Preiss S, Schrader S, Johanningmeier U (2001) Rapid, ATP-dependent degradation of a truncated D1 protein in the chloroplast. *Eur. J. Biochem.* 268 (16): 4562–4569.

- Pribil M, Labs M, Leister D (2014) Structure and dynamics of thylakoids in land plants. *J. Exp. Bot.* 65: 1955-1972.
- Rich PR (2004) The quinone chemistry of bc complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1658: 165–171.
- Rokka A, Suorsa M, Saleem A, N Battchikova, Aro EM (2005) Synthesis and assembly of thylakoid protein complexes: multiple assembly steps of photosystem II. *Biochem. J.* 388: 159–168.
- Rumeau D, Peltier G, Cournac L (2007) Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant Cell Environ.* 30: 1041–1051.
- Schansker G, Tóth SZ, Strasser RJ (2005) Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl *a* fluorescence rise OJIP. *Biochim. Biophys. Acta* 1706: 250–261.
- Schansker G, Tóth SZ, Strasser RJ (2006) Dark-recovery of the Chl-*a* fluorescence transient (OJIP) after light adaptation: the qT-component of non-photochemical quenching is related to an activated photosystem I acceptor side. *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 787–797.
- Schansker G; Tóth SZ, Holzwarth AR; Garab G (2014) Chlorophyll *a* fluorescence: beyond the limits of the Q(A) model. *Photosynth. Res.* 120:43-58.
- Schreiber U, Neubauer C, Klughammer C (1989) Devices and methods for room-temperature fluorescence analysis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 323: 241–251.
- Schreiber U, Klughammer C (2008) Non-photochemical fluorescence quenching and quantum yields in PS I and PS II: analysis of heat-induced limitations using Maxi-Imaging-PAM and Dual-PAM-100. *PAM Application Notes* 1: 15–18.
- Schuster G, Timber R, Ohad I (1988) Turnover of thylakoid photosystem II proteins during photoinhibition of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* 177: 403–410.
- Scoma A, Krawietz D, Faraloni C, Giannelli L, Happe T, Torzillo G (2012) Sustained H<sub>2</sub> production in a *Chlamydomonas reinhardtii* D1 protein mutant. *J. Biotechnol.* 157: 613–619.
- Seeler H, Poetsch A, Dencher NA, Engel A, Stahlberg H and Müller DJ (2000) Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature* 405: 418–419.
- Seeler H, Dencher NA and Müller DJ (2003) Fourteen promoters compose the oligomer III of the proton-rotor in spinach chloroplast ATP synthase. *J. Mol. Biol.* 333: 337–344.
- Shahenshah, Isoda A (2010) Effects of water stress on leaf temperature and chlorophyll fluorescence parameters in cotton and peanut. *Plant Prod. Sci.* 13: 269–278.
- Shao HB, Chu LY, Lu ZH, Kang CM (2008) Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *Int. J. Biol. Sci.* 4: 8–14.
- Shikanai T (2007) Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 199–217.
- Shimoni E, Rav-Hon O, Ohad I, Brumfeld V, Reich Z (2005) Threedimensional organization of higher-plant chloroplast thylakoid membranes revealed by electron tomography. *Plant Cell* 17: 2580–2586.
- Smirnoff N (2000) Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355: 1455–1464.
- Smirnoff N (2011) Vitamin C: the metabolism and functions of ascorbic acid in plants. *Adv. Bot. Res.* 59: 107–177.
- Spetea C, Hideg E, Vass I (1997) Low pH accelerates light-induced damage of photosystem II by enhancing the probability of the donor-side mechanism of photoinhibition. *Biochim Biophys Acta* 1318: 275–283.
- Spruit CP (1958) Simultaneous photoproduction of hydrogen and oxygen by *Chlorella*. *Meded Landbouwhogeschool Wageningen* 58: 1–17.



- Srivastava A, Guissé B, Greppin H, Strasser RJ (1997) Regulation of antenna structure and electron transport in photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient: OKJIP. *Biochim. Biophys. Acta* 1320: 95–106.
- Staehelin LA (2003) Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes. *Photosynth. Res.* 76: 185–196.
- Standfuss R, van Scheltinga ACT, Lamborghini M, Kuhlbrandt W (2005) Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *EMBO J* 24: 919–928.
- Strasser RJ, Srivastava A, Govindjee (1995) Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.* 61: 32–42.
- Stuart TS, Gaffron H (1972) The mechanism of hydrogen photoproduction by several algae: II. The contribution of photosystem II. *Planta* 106: 101–112.
- Süss KH and Schmidt O (1982) Evidence for an  $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , I, II,  $\epsilon$ , III<sub>5</sub> subunit stoichiometry of chloroplast ATP synthetase complex (CF<sub>1</sub>-CF<sub>0</sub>). *FEBS Letters* 144: 213–218.
- Tamura N, Inoue H, Inoue Y (1990) Inactivation of the water-oxidizing complex by exogenous reductants in PSII membranes depleted of extrinsic proteins. *Plant Cell Physiol.* 31: 469–77.
- Teramoto H, Ono T, Minagawa J (2001) Identification of Lhcb gene family encoding the light-harvesting Chlorophyll-a/b proteins of Photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 42: 849–856.
- Toepel J, Illmer-Kephalides M, Jaenicke S, Straube J, May P, Goesmann A, Kruse O (2013) New insights into *Chlamydomonas reinhardtii* hydrogen production processes by combined microarray/RNA-seq transcriptomics. *Plant Biotechnol. J.* 11: 717–733.
- Torzillo G, Scoma A, Faraloni C, and Luca Giannelli (2014) Advances in the biotechnology of hydrogen production with the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Crit. Rev. Biotechnol.* (impress; early online)
- Tóth SZ, Schansker G, Kissimon J, Kovács L, Garab G, Strasser RJ (2005) Biophysical studies of photosystem II-related recovery processes after a heat pulse in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *J. Plant Physiol.* 162: 181–194.
- Tóth SZ, Schansker G, Garab G, Strasser RJ (2007a) Photosynthetic electron transport activity in heat-treated barley leaves: the role of internal alternative electron donors to photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 295–305.
- Tóth SZ, Schansker G, Strasser RJ (2007b) A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP-transient. *Photosynth. Res.* 93: 193–203.
- Tóth SZ, Puthur JT, Nagy V, Garab G (2009) Experimental evidence for ascorbate-dependent electron transport in leaves with inactive oxygen-evolving complexes. *Plant Physiol.* 149: 1568–1578.
- Tóth SZ, Nagy V, Puthur JT, Kovács L, Garab G (2011) The physiological role of ascorbate as photosystem II electron donor: protection against photoinactivation in heat-stressed leaves. *Plant. Phys.* 156: 382–392.
- Tóth SZ, Schansker G, Garab G (2013) The physiological roles and metabolism of ascorbate in chloroplasts. *Physiol. Plant.* 148: 161–175.
- Turcsányi E, Vass I (2000) Inhibition of photosynthetic electron transport by UV-A radiation targets the Photosystem II complex, *Photochem. Photobiol.* 72: 513–520.
- Tyystjärvi E (2008) Photoinhibition of Photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster. *Coordination Chemistry Reviews* 252: 361–376.
- Umena Y, Kawakami K, Shen JR, Kamiya N (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature* 473: 55–60.
- Urzica EI, Adler LN, Page MD, Linster CL, Arbing MA, Casero D, Pellegrini M, Merchant SS, and Clarke SG (2012) Impact of oxidative stress on ascorbate biosynthesis in

- Chlamydomonas* via regulation of the *VTC2* gene encoding a GDP-L-galactose phosphorylase. J. Biol. Chem. 287: 14234–14245.
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnov N (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. Nature 393: 365–369.
- White AJ and Critchley C (1999) Rapid light curves: A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. Photosynth. Res. 59: 63–72.
- White AL, Melis A (2006) Biochemistry of hydrogen metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* wild type and a Rubisco-less mutant. Int. J. Hydrogen Energy. 31: 455–464.
- Wientjes E, Croce R (2011) The light-harvesting complexes of higher-plant photosystem I: lhca1/4 and Lhca2/3 form two red-emitting heterodimers. Biochem. J. 433: 477–485.
- Wiessner W, Demeter S (1988) Comparative thermoluminescence study of autotrophically and photoheterotrophically cultivated *Chlamydomonas reinhardtii*. Photosynth. Res. 18: 345–356.
- Williams CR, Bees MA (2014) Mechanistic modeling of sulfur-deprived photosynthesis and hydrogen production in suspensions of *Chlamydomonas reinhardtii*. Biotechnol. Bioeng. 111: 320–335.
- Wykoff DD, Davies JP, Melis A, Grossman AR (1998) The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. 117: 129–139.
- van Amerongen H, Croce R (2013) Light harvesting in photosystem II. Photosynth. Res. 116: 251–263.
- van Wijk KJ, Nilsson LO, Styring S (1994) Synthesis of reaction center proteins and reactivation of redox components during repair of photosystem II after light-induced inactivation. J. Biol. Chem. 269: 28382–28392.
- I. Vass, S. Styring, T. Hundal, A. Koivuniemi, E.-M. Aro, B. Andersson (1992) Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of Photosystem II: stable reduced QA species promote chlorophyll triplet formation. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 89: 1408–1412.
- Vass I, Sass L, Spetea C, Bakou A, Ghanotakis D, Petrouleas V (1996) UV-B induced inhibition of Photosystem II electron transport studied by EPR and chlorophyll fluorescence. Impairment of donor and acceptor side components. Biochemistry 35: 8964–8973.
- Vass I (2003) The history of photosynthetic thermoluminescence. Photosynth. Res. 76: 303–318.
- Vass I, Cser K (2009) Janus-faced charge recombinations in photosystem II photoinhibition. Trends Plant Sci. 14: 200–205.
- Vass I (2012) Molecular mechanisms of photodamage in the photosystem II complex. Biochim. Biophys. Acta 1817: 209–217.
- Vignais PM, Colbeau A (2004) Molecular biology of microbial hydrogenases. Curr. Issues Mol. Biol 6: 159–188.
- Vinyard DJ, Ananyev GM, Dismukes GC (2013) Photosystem II: The reaction center of oxygenic photosynthesis. Annu. Rev. Biochem. 82: 577–606.
- Volgusheva A, Styring S, Mamedov F (2013) Increased photosystem II stability promotes H<sub>2</sub> production in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. PNAS 110: 7223–7228.
- Zhang L, Happe T, Melis A (2002) Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H<sub>2</sub>-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). Planta 214: 552–561.
- Zhang Z, Shrager J, Jain M, Chang CW, Vallon O, Grossman AR (2004) Insights into the survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur starvation based on microarray analysis of gene expression. Eukaryotic Cell 3: 1331–1348.

- Yamane Y, Kashino Y, Koike H, Satoh K (1998) Effects of high temperatures on the photosynthetic systems in spinach: oxygen-evolving activities, fluorescence characteristics and the denaturation process. *Photosynth. Res.* 57: 51–59.
- Yamashita T, Butler WL (1968) Photoreduction and photophosphorylation with Tris-washed chloroplasts. *Plant Physiol.* 43: 1978–1986.
- Yamashita A, Nijo N, Pospíšil P, Morita N, Takenaka D, Aminaka R, Yamamoto Y, Yamamoto Y (2008) Quality control of photosystem II: reactive oxygen species are responsible for the damage to photosystem II under moderate heat stress. *J. Biol. Chem.* 283: 28380–28391.
- Yerkes CT, Babcock GT (1980) Photosystem II oxidation of charged electron donors: surface charge effects. *Biochim. Biophys. Acta* 590: 360–372.
- Yoshioka M, Uchida S, Mori H, Komayama K, Ohira S, Morita N, Nakanishi T, Yamamoto Y (2006) Quality control of photosystem II: cleavage of reaction center D1 protein in spinach thylakoids by FtsH protease under moderate heat stress. *J. Biol. Chem.* 281: 21660–21669.